Aus dem Kgl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M.
(Direktor: Geh. Rat Prof. Dr. P. Ehrlich.)

Über einen in biologischer Beziehung interessanten Kolistamm (Bacterium coli mutabile). Ein Beitrag zur Variation bei Bakterien.

Stanford University Library
AUG 22 1908

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Rudolf Massini,
ehem. Assistent am Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M.
z. Z. Assistenzarzt der medizinischen Klinik des Basler Bürgerspitals.

München.
Druck von R. Oldenbourg.
1907.

Aus dem Kgl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M.
(Direktor: Geh. Rat Prof. Dr. P. Ehrlich.)

Über einen in biologischer Beziehung interessanten Kolistamm (Bacterium coli mutabile). Ein Beitrag zur Variation bei Bakterien.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Rudolf Massini,
ehem. Assistent am Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M.
z. Z. Assistenzarzt der medizinischen Klinik des Basler Bürgerspitals.

München.
Druck von R. Oldenbourg.
1907.

Sonderabdruck aus dem „Archiv für Hygiene“.

Dem Andenken meines Vaters

gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/ubereineninbiolo0000rudo

Mit Beobachtungen über Variabilität von Bakterien in die Öffentlichkeit zu treten, scheint heutzutage für einen Bakteriologen verwunderlich. Die Zeiten sind noch nicht so lange vorbei, da an eine Umwandlung der Bakterienart in eine andere oder an eine autochtone Entstehung von pathogenen Mikroorganismen aus Saprophyten geglaubt wurde. Aber alle Versuche, welche dies beweisen sollten, haben sich als nicht stichhaltig herausgestellt. Die meisten derartigen Untersuchungen wurden zu einer Zeit ausgeführt, da es infolge der jungen, noch primitiven Methodik überhaupt noch nicht gelang, einzelne Arten sicher von anderen zu trennen. Es ist klar, dafs, wenn man von Varietäten reden will, man zuerst feststehende genau umschriebene Arten haben mufs, von welchen dann die veränderten neuen Formen als neue wieder konstant bleibende Formen abzweigen können. Auf diese ersten verfrühten Versuche will ich nicht näher eintreten. Da die ersten Versuche aber durch Vermischung und Identifizierung mühsam voneinander getrennter Arten grofses Unheil anrichteten, besonders bei der Berühmtheit einiger ihrer Verfechter (Billroth, Naegeli), bildete sich nach ihrer Überwindung eine entgegengesetzte Richtung aus. Man sucht zu trennen, wo immer nur möglich, und seit uns die Natur durch ihre Immunprodukte so feine Reagentien in die Hand gegeben hat, werden auch diese in ausgiebiger Weise benutzt. Diese Tendenz besteht ganz zu Recht, denn es ist

meist leichter Arten wieder zusammenzuführen, als solche voneinander zu trennen. Es müssen in der Bakteriologie alle Eigenschaften, auch biologische, sofern sie nur konstant sind, für ein Bacterium zu seiner Identifizierung hinzugezogen werden. Es sind daher in der letzten Zeit nur ganz wenige Versuche gemacht worden, Variationen nachzuweisen und diesen wenigen Versuchen wird gröfstes Mifstrauen entgegengebracht und zwar mit voller Berechtigung, denn nirgends findet sich die nötige Garantie für die dauernde Reinheit und Einheit der Kultur. Diese ist aber das erste Erfordernis, wenn Versuche über Varietätenbildung angestellt werden sollen. Jeder, der lange Kulturen weiter gezüchtet hat, weifs, wie leicht Verunreinigungen auch bei der gröfsten Sorgfalt vorkommen; wie ein Meningokokkus oder Gonokokkus allmählich scheinbar Gram-positiv wird, wenn ein harmloser aber resistenterer Luftkeim oder ein im Ascitesagar schlummernder Keim sich im Laufe der Generationen die Herrschaft über den schwächeren Gram-negativen Kokkus erobert. Besonders schwierig ist, wie schon M. Neisser[10] aufmerksam macht, verwandte Arten wie Diphtheriebazillen und Pseudodiphtheriebazillen oder Xerosebazillen voneinander zu trennen. Es kann also allen diesen Versuchen nicht genug Kritik entgegengebracht werden und alle Versuche, welche nicht durch beständige Isolierung und beständiges Ausgehen von einer Kolonie die Reinheit kontrollieren, können nicht als beweisend für eine Aberrationsbildung gelten. Die Kritik an der Reinheit der Kultur wird um so mehr herausgefordert, wenn es sich um Umzüchtungen bei überall verbreiteten Formen, z. B. Kokken, handelt.

Bevor ich an die Darlegung meiner eigenen Beobachtungen gehe, sei es mir gestattet, in kurzem über die letzten Arbeiten über Varietätenbildung zu berichten. Da es bekannt ist, dafs schon unter gewöhnlichen Laboratoriumsbedingungen die Farbstoffproduktion gewisser Bakterien sehr verschieden stark ausgebildet ist, und da man in der Farbe einen zugleich quantitativ und qualitativ bequemen Index hatte, so wandten sich die meisten Untersucher dem Studium der farbstoffbildenden Bakterien zu. Es handelte sich darum, diese natürlich auftretenden neuen

Formen zur Züchtung von festen Arten zu verwenden, und da man dieselben willkürlich erhalten wollte, mufsten auch die Bedingungen, unter denen Farbbildung überhaupt auftrat, studiert werden. So beschrieb R. Neumann(9) wie es ihm gelungen sei, aus einem Micrococcus pyogenes α aureus eine gelbe und eine weifse Rasse zu züchten, welche sich vom natürlich vorkommenden Micrococcus citreus und albus nicht unterscheiden liefsen. Aufserdem erhielt er eine Rosa-Varietät, aus welcher er wieder die orangefarbene Form erhalten konnte.

Ruczicka(15) berichtet über Annäherung des Bacillus pyocyaneus an den Bacillus fluorescens liquefaciens. Ruczicka züchtete drei Stämme Bacillus pyocyaneus und drei Bacillus fluorescens. Die drei Pyocyaneus-Stämme waren aus Eiter gewonnen und hatten daher die Eigenschaften echter Parasiten; sie lieben hohe Temperaturen, bilden darin mehr Farbe und wachsen üppiger als bei tiefen Temperaturen, während die aus dem Wasser gezüchteten Fluorescenzstämme niedere Temperaturen bevorzugen. Die Farbe der Pyocyaneusstämme hat eine mehr grünblaue, die der Fluorescenzstämme eine mehr gelbgrüne Nuance. Die übrigen Eigenschaften: Fähigkeit, die Gelatine zu verflüssigen, die Milch zur Gerinnung zu bringen, hatten beide gemeinsam. Alle Eigenschaften sind bei den verschiedenen Stämmen der einen oder der anderen Bakterienart sehr verschieden stark ausgebildet, ferner variieren sie innerhalb der einzelnen Rassen. Es gelang nun Ruczicka, unter Benutzung dieser an und für sich nicht ganz konstanten Verhältnisse aus einem aus dem Wasser stammenden Fluorescenzstamm eine Rasse zu erhalten, welche üppiger bei 37° wuchs und einen blauen Farbenschimmer hatte und umgekehrt aus einem Bacillus pyocyaneus einen bei Zimmertemperatur üppiger vegetierenden, fast ohne blauen Farbenton wachsenden Stamm zu erhalten. Angaben über das Lösungsvermögen der Farben dieser Stämme in Chloroform und anderen Mitteln fehlen.

Luckard(8) berichtet über einen Bac. prodigiosus der, nachdem er einige Zeit weifs gewachsen war, plötzlich wieder rot wuchs. Der Grund dazu sollen molekulare innere Umwälzungen sein.

Gegen alle diese Untersuchungen läfst sich aufser Zweifeln an der Reinheit, welche, wie ich schon betonte, immer vorhanden sein müssen, wo nicht stete Kontrolle herrscht, noch anderes vorbringen. Dieser Farbstoffbildung fehlt an und für sich schon das Konstante, wo aber nichts Konstantes vorhanden ist, kann keine neue Varietät angenommen werden, wenn auch eine der normalerweise schon vorhandenen, und mit anderen abwechselnden Formen einige Zeit konstant bleibt, um dann plötzlich bei irgendeiner Gelegenheit zur alten Form wieder zurückzuspringen. Unsere Kenntnisse über die Bedingung der Farbstoffbildung sind noch so gering, dafs uns diese von Zufälligkeiten in der Herstellung der Nährböden abhängig erscheint, die wir noch nicht genügend beherrschen.

Noefske[12]) und Kuntze[7]) haben gezeigt, dafs zur Farbstoffproduktion des Bacillus pyocyaneus und des Bacillus prodigiosus die Anwesenheit von Magnesium-Schwefelverbindungen nötig ist, dafs aber von diesen Stoffen schon 0,001 % genügen, um die Farbe zu erhalten. Wenn daher z. B. ein orangefarbener Mikroorganismus einige Zeit in einigen Partien der Kultur rosa wächst und einige Zeit hindurch in dieser Farbe gehalten werden kann, um dann plötzlich wieder eine Tendenz zu einem orangefarbenen Wachstum zu erlangen, wer beweist uns, dafs das nicht von Veränderungen im Nährboden, wenn diese auch nicht kontrollierbar sind, abhängen können? Wenn aber ein orangefarbener Mikroorganismus rosa wächst, wenn er auf einen neuen anders zusammengesetzten Nähragar gebracht wird, kann das nicht als echte Variation angesehen werden.

Dann ist bei dieser Art der Züchtung auf schrägem Agar oder durch Gelatine- oder Agarstich eine richtige, systematische Selektion unmöglich. Auch wenn in unserem Beispiel von einem etwas röterem Teil einer orangefarbenen Strichkultur abgeimpft wird, um durch Selektion einen ganz roten Stamm zu erhalten, so züchtet man immer Kulturen, welche von Millionen von Bakterien ausgehen, unter welchen wohl die gewünschten aber auch viele nicht gewünschte Bakterien sich befinden, deren Kolonien wieder zu einer gleichmäfsigen Kultur sich vermischen.

Ganz anders sind die Bedingungen bei einer Aussaat; hier entstehen die Kolonien aus einzelnen Bakterien, man erhält viel einheitlicheres Material und sieht bei einer neuen Aussaat von einer Kolonie, ob sich die Tochterkolonien untereinander gleich verhalten oder nicht; man kann im letzteren Falle diejenigen Kolonien, welche durch Besonderheiten auffallen, einzeln weiter verimpfen, ohne sich die neue Kultur durch Mitverimpfung nichtgewünschter Kolonien zu verderben.

Auch dagegen mufs Front gemacht werden, dafs die Identität zweier Bakterienarten, einer künstlich gezüchteten und einer in der Natur vorkommenden, erklärt wird auf Grund von sehr inkonstanten oder degenerativen Eigenschaften. Besonders bei Vergleichung verschiedener Kokken mufs davor gewarnt werden, zu früh zu identifizieren, bevor nicht alle Mittel, auch hämolytisches Vermögen, Tierpathogenität und Agglutination, letztere allerdings mit Vorsicht, herangezogen wurden. Ein Micrococcus pyocyaneus aureus, der weifs wächst und etwas weniger Alkali bildet, kann ein degenerierter aureus sein und braucht daher noch lange nicht mit einem Micrococcus albus identisch zu sein, der im Vollbesitze aller seiner Eigenschaften ist.

Zum Schlusse möchte ich noch etwas anfügen, was vielleicht ebenfalls beitragen kann, die Entstehung verschiedenfarbiger Rassen zu erklären, ohne Varietätenbildung annehmen zu müssen.

Channot und Thiry[3]) extrahierten einen Farbstoff aus einer Kultur des Bacillus polychromogenes und stellten Versuche über dessen Farbe bei verschiedenen Säure- und Alkalitätsgraden an. Es zeigte sich, dafs Säure in Spuren violett färbte, ein Überschufs derselben purpurrot bis rot, Ammoniak liefs eine rote Farbe entstehen, Kalihydrat, Natriumhydrat und Barythydrat machten den Farbstoff violett, im Überschusse grün. Sehen wir so, dafs dieselbe Säure oder Base, je nachdem sie in Spuren oder in stärkeren Konzentrationen angewandt wird, die Farbe des gleichen Farbextraktes ändern kann, so läfst sich denken, wie ein Bakterienstamm eventuell eine andere Färbung zeigen kann, wenn ihm durch Schädigung die Fähigkeit genommen wird, stärkere Säuren oder Alkalien zu bilden. In einem solchen Falle

hätte dann die Bildung einer anderen Farbe eine andere Bedeutung; man könnte weniger von Varietät als von einer Degeneration des Stammes sprechen.

Ganz in degenerativer Richtung liegen die Versuche von Schierbeck[16]). Er züchtete Milchsäurebakterien in karbolhaltiger Milch. Nach einigen Züchungen auf diesem Boden fiel das Säuerungsvermögen, um aber auf normalem Boden bald wieder zur früheren Höhe anzuwachsen. Wurde aber die Züchtung in Karbolmilch 45 Generationen hindurch weitergetrieben, so erhielt Schierbeck einen Stamm, der auch in gewöhnlicher Milch die Fähigkeit der Säuerung in definitiv geringerm Grade hatte als der Stamm, von dem er abgezweigt worden war.

Zu der gleichen Gruppe gehören alle Virulenzverluste der Bakterien, von welchen wohl jeder Bakteriologe Beispiele genug kennt.

Interessant sind die Beobachtungen Beyerincks[2]) über verschiedene Arten von Variationen, da hier nicht die Veränderungen an Agarstrichkulturen, sondern an Aussaaten festgestellt wurden. Genauere Angaben liegen vor über die Variation einer Hefeart, beim Bacillus prodigiosus und einem Wasserbakterium (Photobacter indicum). Uns interessieren hier die beiden letzten Variationen. Beyerinck hatte 3 Prodigiosusstämme gezüchtet, davon verflüssigte einer Gelatine nicht, wohl aber die beiden anderen, welch letztere sich durch die Fähigkeit bzw. Unfähigkeit, gewisse Kohlehydrate zu vergären, voneinander unterschieden. Alle 3 Stämme bildeten rote Farbe. Von allen 3 Stämmen erhielt Beyerinck farblose Varianten, welche farblos blieben, sich im übrigen aber so verhielten wie ihre Mutterkulturen. Subvarianten, d. h. Rosa-Kolonien, waren viel seltener, sie waren ebenfalls konstant, aber es trat leichter Atavismus auf als bei den Varianten. Auch aus den Subvarianten entstand die weifse Variation. Auf eine sehr lange Beobachtungszeit von 13 Jahren stützen sich Beyerincks Versuche über das Photobacter indicum. Er erhielt, besonders bei Verimpfung älterer Kulturen, neben den normalen beweglichen leuchtenden Formen eine solche, welche nicht leuchtete (Phot. ind. obscurum) und

eine sehr langsam wachsende, schwach bewegliche Form (Phot. ind. parvum). Auch hier treten Zwischenstufen, Subvarianten, seltener auf als die Varianten und sind weniger konstant als diese. Im Meerwasser fand Beyerinck diese Variationen nicht, wohl aber 2 andere Varianten oder sehr nahe verwandte Arten des Phot. ind.

Conn[4] berichtet, wie es ihm durch Selektion einzelner Kolonien aus Platten gelang, verschiedene in der Milch natürlich vorkommende Bakterienarten zu züchten.

Einige kurze Angaben über Varietäten lasse ich hier unberücksichtigt, da sie entweder erst nach ihrer Entstehung beobachtet wurden — uns interessiert aber hauptsächlich der Modus der Entstehung —, oder da die Angaben zu lückenhaft und unsicher sind, um verwertet zu werden.

Die angeführte Literatur zeigt, dafs der Begriff Variabilität sehr verschieden weit gefafst wird. Es erscheint daher angebracht, über den Begriff der Variabilität, wie er bis jetzt in der Bakteriologie gehandhabt wurde, einiges zu berichten. Es existieren zweierlei Systeme, in welchen die verschiedenen Arten von Variabilität eingereiht werden können. Dasjenige von Rodet[14] umfafst alle Arten von bei gleichen Bakterienstämmen beobachteten verschiedenen Zuständen mit Ausnahme der aufeinanderfolgenden Entwicklungsphasen eines Individiums. Beyerinck[1] zieht seine Grenzen enger, einige von Rodet noch als Varietäten bezeichnete Veränderungen zählt Beyerinck nicht mehr dazu.

Rodet unterscheidet 3 Arten von Variabilität:

1. Poly- oder Pleomorphismus. Ein Bakterium zeigt auf verschiedenem Nährboden verschiedene Gestalt. Für jeden Nährboden ist die Form typisch, sie wird so lange beibehalten, als das Bakterium auf diesem Nährboden wächst.
2. Pluriformität. Betrachtet man die Kolonien einer Aussaat aufmerksam, so sieht man, wie nie alle Kolonien ganz gleich aussehen, sondern wie immer einige etwas andere Form haben. Wird von einer dieser Kolo-

nien wieder eine Aussaat gemacht, so tritt nicht der Typ, welchem die verimpfte Kolonie angehört hat, etwa allein auf, sondern immer wieder die auf der ersten Platte vorhandenen Typen (z. B. Diphtherie.)

3. Variabilität im engeren Sinne. Die Bakterien einer Kultur erhalten unter bestimmten Voraussetzungen von den bis dahin vorhandenen abweichende Eigenschaften und behalten diese in der Folge bei, auch wenn sie wieder unter die alten Bedingungen gestellt werden. Rodet bemerkt dazu, dafs diese neueren Arten meist degenerative Charaktere tragen.

Beyerinck teilt die Variationsbildungen bei Bakterien folgendermafsen ein:

1. Degeneration. Frisch gezüchtete Kulturen verlieren allmählich gleich nach der Züchtung noch vorhandene Eigenschaften. Die Degeneration endigt mit der Unmöglichkeit, die Kultur weiter zu züchten. Sie betrifft alle Individuen gleichzeitig. Eine Selektion einzelner ist daher nicht möglich.
2. Transformation. Alle Bakterien einer Kultur verlieren eine Eigenschaft oder erhalten eine neue, oder verlieren eine solche und erhalten gleichzeitig eine andere. Sie ist selten. Die neu entstandenen Formen sind konstant.
3. Variation im engeren Sinne. Sie ist die häufigste Form. Einzelne Individuen eines Stammes erhalten eine neue Eigenschaft und vererben diese sogleich konstant weiter an ihren Nachkommen; Atavismus kommt zwar vor, ist aber selten. Als Grund gibt Beyerinck ungenügende Ernährung, Anhäufung eigener Sekretionsprodukte in alten Kulturen an.

Nicht alle dieser hier aufgezählten Gruppen von Variabilität haben gleiches Interesse. Weniger interessant sind in degenerativem Sinne tendierende Veränderungen, weil dadurch nur Arten verschwinden, nie aber neue entstehen können. Wichtig sind

dagegen diejenigen Variationen, welche bis dahin noch nicht vorhandene Eigenschaften zeigen. Mufs doch in phylogenetischem Sinne eine Variabilität vorhanden gewesen sein, da wir annehmen können, dafs unsere jetzt vorhandenen Bakterienarten nicht immer so bestanden haben wie jetzt, sondern dafs auch bei den Bakterien weniger differenzierte Formen vorhanden waren, aus welchen die jetzigen Arten entstanden. Mufs nun auch eine solche Variabilität vorhanden gewesen sein, so ist doch die Frage, ob sich eine solche in der kurzen Spanne Zeit eines Experimentalversuches nachweisen läfst. Wenn damit auch kaum ein auf phylogenetischen Tatsachen aufgebautes System erhalten werden kann, wie es z. B. in der Zoologie besteht, so geben uns derartige Beobachtungen doch den Beweis, dafs Variationen überhaupt vorkommen können, und zeigen uns auch, wie diese vor sich gehen. Nebenbei erhalten wir auch richtige Anhaltspunkte für die Wertung von Eigenschaften der Bakterien, je nachdem sie sich bei diesen Versuchen konstant oder weniger konstant erweisen. Es beansprucht daher jeder Fall von wirklich beobachteter Variabilität ein Interesse, gerade bei der Spärlichkeit von sicheren Beobachtungen aus diesem Gebiete.

Dabei darf es sich nicht nur um Veränderungen handeln, welche vorwiegend den Charakter der Degeneration und des Verlustes von Eigenschaften oder die Merkmale einer allgemein herabgestimmten Lebensenergie haben, sondern unser Interesse wird hauptsächlich dann erweckt, wenn es sich um neu auftretende Eigenschaften handelt, ohne nachweisbare degenerative Symptome.[1]) Hierbei wird es weiter von grofser bio-

1) Als ich nach Abschlufs dieser Arbeit, und als Herr Massini bereits wieder in Basel Assistent war, auf der 1. Mikrobiologischen Vereinigung in Berlin über diese Arbeit referierte (s. Zentralbl. f. Bakt. 1906), wurde von Herrn Hofrat Gruber in der Diskussion eine unter seiner Leitung entstandene Arbeit von Firtsch erwähnt, die uns entgangen war, und die einen ähnlichen Fall behandelt. Firtsch beschreibt (Archiv f. Hyg., VIII, S. 369) verschiedene Kolonieformen des Vibrio Finkler-Prior, die man erhält, wenn man von alten Gelatinestichkulturen diese Mikrobengelatineplatten gieſst. Trotz erwiesener Reinheit des Ausgangsmaterials erhält man so neben den typischen Kolonien andere Kolonienformen, die auch bei Weiterzüchtung

logischer Wichtigkeit sein, ob die Variation eine allmählich entstehende Umwandlung oder eine sprungweise Variation im Sinne der de Vriesschen Mutation ist.

Voraussetzung für alle in dieser Richtung liegenden Versuche ist die dauernde Reinheit und Einheitlichkeit der Kultur.

Ich glaube, dafs der im folgenden zitierte Fall diesen Anforderungen gerecht wird und deshalb ein biologisches Interesse beanspruchen darf.

A. Die Knötchen.

Die Beobachtungen, über welche ich im folgenden berichten werde, wurden auf Veranlassung und unter der Leitung von Prof. Max Neisser an einem Bakterium der Typhus-Koli-Gruppe angestellt.

Das Bakterium wurde aus dem Stuhle eines an kurzer fieberloser Gastro-Enteritis leidenden 18jährigen Arbeiters gezüchtet.

Auf Endonährböden, auf welchem er isoliert wurde, wächst unser Bakterium ähnlich wie der Typhusbazillus farblos, nur saftiger und nicht so durchscheinend wie dieser. Nach einigen Tagen wird die Farbe der Kolonie etwas röter, erhält aber nie den metallischgrünen Fuchsinglanz, wie ihn die Kolonien des gewöhnlichen Bacterium coli commune auf Endoagar zeigen. Ich möchte hierzu bemerken, dafs der Endonährboden, wie be-

---

ihre abweichenden Eigenschaften bewahren. Und den atypischen Koloniformen entsprechen auch atypische mikroskopische Formen und atypisches Aussehen im Stich. Wenn ich trotzdem diesen gewifs interessanten Fall nicht auf dieselbe Stufe stelle wie den Massinischen, so geschieht es, weil Firtsch selbst sagt: »So bedeutend die Unterschiede im Aussehen der Kolonien auf Nährgelatine sind, so lassen sie sich doch mit grofser Wahrscheinlichkeit auf verschiedene Grade von Abschwächung der Wachstumsenergie überhaupt, der Fähigkeit, die Gelatine zu verflüssigen und der Eigenbewegung zurückführen; Abschwächungsvorgänge, die gewifs nicht bedeutsamer sind als der Verlust der Fähigkeit, Sporen zu bilden, der Gärtätigkeit, der Virulenz«. Die Erscheinungen am Vibrio Finkler sind also degenerativer Natur, unser Kolistamm zeigt das plötzliche Auftreten einer neuen Eigenschaft, die plötzliche Produktion der Laktase. Gerade in der Neuerwerbung einer Eigenschaft sehe ich aber das biologisch Interessante unseres Falles.

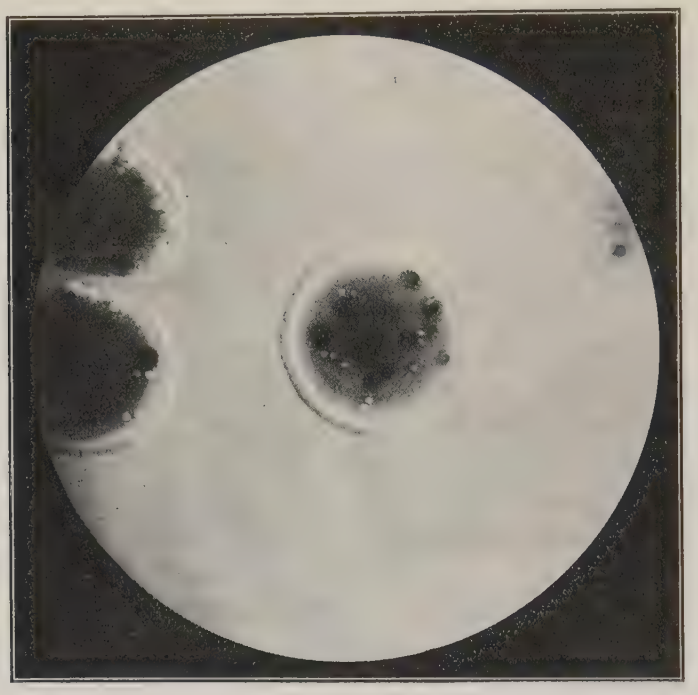
M. Neifser.

kannt, an sich nicht ganz farblos bleibt, wenn er, besonders bei Anwesenheit von Kondenswasser, aber auch ohne solches im Brutschrank bei 37° steht, sondern dafs er einen Rosa-Farbenton annimmt. Die Kolonie behält diesen Farbenton bis zu ihrem Absterben bei. Um einige besonders grofse und alte Kolonien habe ich oft einen hellen Hof bis zu 1 cm Breite bemerkt, indem dort die normale Rosafärbung des Endoagars durch eine von der Kolonie ausgeschiedene diffundierende Substanz verhindert wird.

Die Form der Kolonien zeigt nun an den zwei ersten Tagen keinerlei Besonderheit, vom 3. Tage an aber entstehen in den noch weiter wachsenden Kolonien kleine, aber mit dem bloſsen Auge leicht sichtbare Knötchen von der Gröfse einer Stecknadelspitze, welche, wenn sie älter werden, die Gröfse eines Stecknadelkopfes erreichen. Diese Knötchen besitzen in der Regel, wenn sie noch jung sind, eine gelblichweifse, durchscheinende Farbe und werden mit dem Alter dunkelrot. Der Umschlag der weifsen Farbe in die rote tritt verschieden schnell auf, bei einigen Knötchen in kürzerer Zeit als einem Tage, bei anderen dauert es länger. Seltener entstehen sie gleich als rote Knötchen. Die Zeit, welche vergeht, bis die Kolonie die Knötchen bildet, ist in der weitaus gröfseren Zahl der Fälle 2 Tage, seltener entstehen sie erst nach dem dritten Tage. Nur ganz extrem selten habe ich sie schon nach 24 Stunden beobachtet. Es war dies unter 112 untersuchten Plattensätzen nur auf 2 Platten der Fall. Die Zahl der Knötchen ist am Tage ihres Auftretens nur gering, 1—4, läfst man aber die Kolonie weiter wachsen, so entstehen täglich neue Knötchen, so dafs in sehr grofsen Kolonien über 200 gezählt werden können (siehe die 2. Photographie). Die ersten Knötchen zeigen sich in dem mittleren Teil der Kolonie, die später hinzukommenden lagern sich um die vorhandenen herum, aber immer so, dafs der wachsende Rand der Kolonie freibleibt.

Stehen die Kolonien auf einer Platte sehr dicht, so dafs sie sich gegenseitig am weiteren Wachstum behindern, so entstehen keine Knötchen. Man erhält daher häufig Platten, auf denen die mehr vereinzelt liegenden gröfseren Kolonien an der Peri-

pherie der Platte Knötchen zeigen, die zentral liegenden kleineren Kolonien aber nicht. Auf der ersten Platte der Endoagaraussaaten, auf welchen die einzelnen Kolonien überhaupt nicht isoliert zu sehen sind, sondern so früh ineinander wachsen, dafs ein Rasen entsteht, sieht man in der Anzahl von 5—20 auf der ganzen

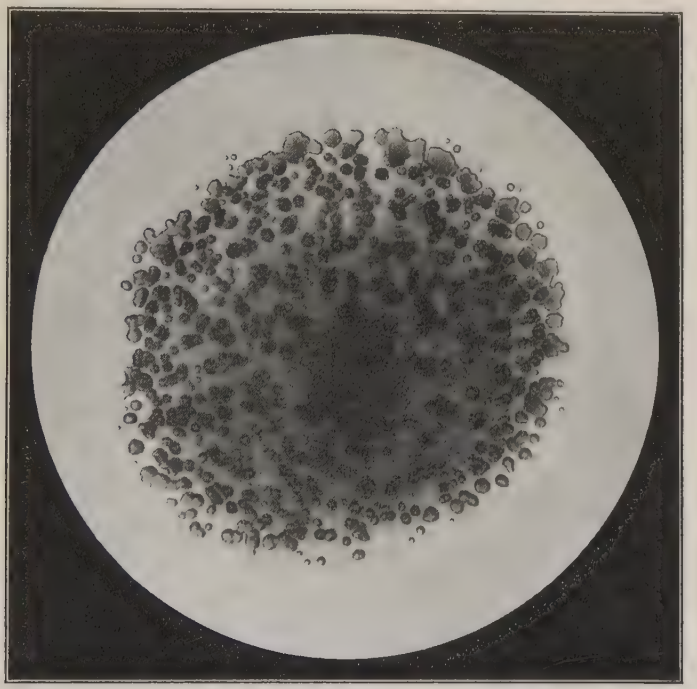


Phot. I.

Platte Gebilde auftreten, welche durch ihre dunklere Färbung und durch Hervorragen aus dem übrigen Rasen auffallen. Sie können als den Knötchen der Kolonien entsprechend angesehen werden, da sie zu gleicher Zeit wie diese entstehen.

Die drei Photographien zeigen 2 Kolonien mit Knötchen, das eine (Phot. I) ist eine sechstägige Kolonie bei ca. sechsfacher Vergröfserung. Man sieht darin deutlich weifse und rote Knötchen. Der Rand der Kolonie tritt sehr stark wallartig hervor, viel stärker als es der Wirklichkeit entspricht. Es ist das wohl die Folge der etwas röteren Färbung des mittleren Teiles der Kolonie,

welcher für die photographische Platte weniger wirksame Strahlen abgibt als die weifsere Randpartie. Die 2. Kolonie (Phot. II u. III) ist 9 Tage alt, sie zeigt, wie grofs alleinstehende Kolonien werden, und wie dicht sie mit Knötchen übersät sein können. Die Photographie gibt die Kolonie in dreifacher Vergröfserung wieder. Auch



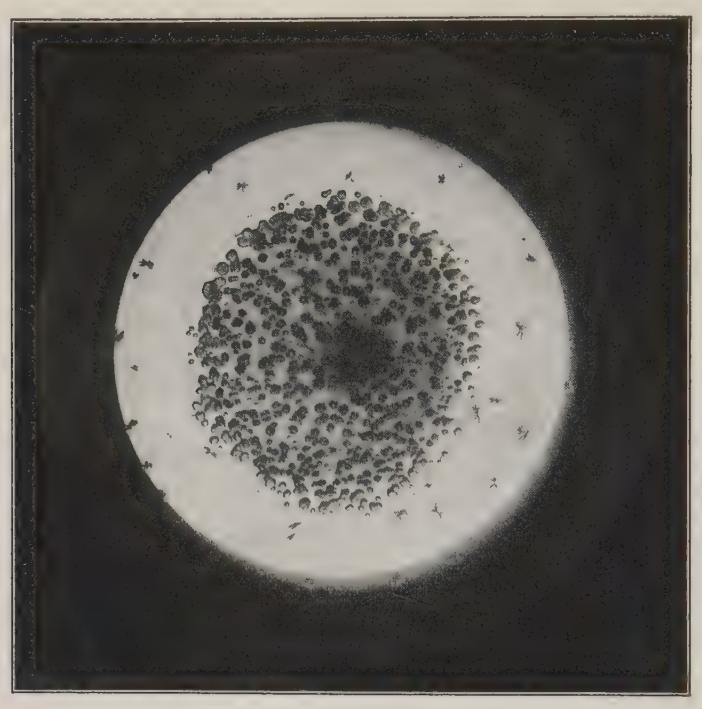
Phot. II.

hier sieht man deutlich den Unterschied zwischen weifsen und roten Knötchen. Einige der Knötchen sind zu kleinen Plaques zusammengeflossen. Photographie III stellt die gleiche Kolonie dar wie Photographie II in etwas kleinerer Vergröfserung. Der Rand der Kolonie ist etwas deutlicher sichtbar geworden. Die Sternchen auf dieser Platte entstanden durch Austrocknen des Agars und haben mit der Kolonie nichts zu tun.

Alle drei Photographien sind nicht retouchiert worden.

Aus was bestehen nun diese Knötchen? — Man mufste zunächst an Gasblasen denken. Dafs es solche nicht waren, stellte

sich bald heraus, denn erstens waren sie durch Evakuieren nicht zum Platzen zu bringen, und dann zeigten Serienschnitte durch Kolonien, dafs die Knötchen solide waren und keinen Hohlraum besafsen. Diese Schnitte genügten auch, um nähere Details über die Knötchen zu geben. Sie wurden erhalten, indem mittelgrofse



Phot. III.

Kolonien in Alkohol fixiert und gehärtet und in Paraffin eingebettet wurden. Es liefsen sich auf diese Weise 6—8 μ dicke Schnitte herstellen. Gefärbt wurden diese zum Teil mit Karbolthionin, zum Teil mit einem Gemisch von Löfflers Methylenblau mit zehnfach verdünntem Karbolfuchsin im Verhältnis 10 : 1. Es zeigen sich die Kolonien (siehe Fig. 1) bei schwacher Vergröfserung aus einzelnen Schichten zusammengesetzt. Diese Schichtung findet sich an allen untersuchten Präparaten verschiedener Kolonien als abwechselnd hellere und dunklere Streifen, welche sich durch die ganze Kolonie hindurchziehen. Bei den mit dem

Methylenblaufuchsingemisch gefärbten Schnitten sind einige Schichten auch mehr rötlich, andere entschiedener blau gefärbt. Diese Schichtung mufs als morphologische Eigenschaft angesehen werden, wie an anderen Kolonien eine radiäre oder konzentrische Streifung. Sie entspricht wahrscheinlich Generationsschüben. Man sieht nun, wie die Knötchen in der Tiefe der Kolonie an der Oberfläche des Agars entstehen und in die Kolonie ein-

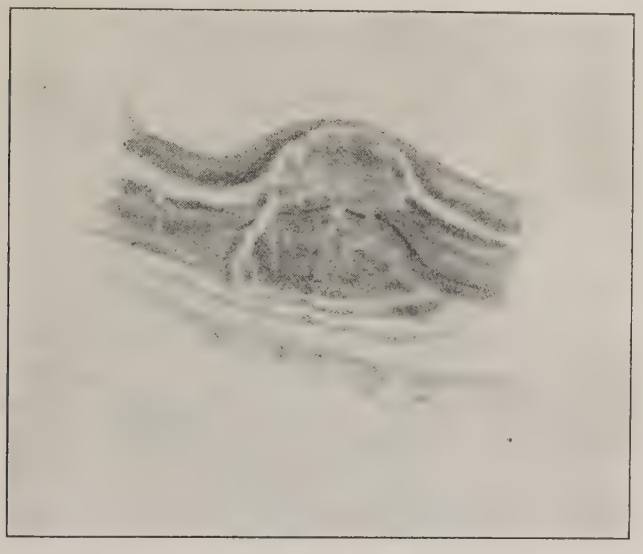


Fig. 1.

wachsen. Wie ein maligner Tumor durchbrechen sie die einzelnen Schichten oder drängen sie auch aus ihrer Lage. Einzelne Schichten scheinen dem Wachstum der Knötchen einen stärkeren Widerstand entgegenzusetzen als andere, man sieht dann, wie das Knötchen verengt wird und sich dann in der nächsten Schicht wieder ausdehnt. Oft sieht man auch eine Andeutung einer besonders resistenten Schicht das Knötchen durchsetzen. Letzteres kann so lange wachsen, bis es die oberste Schicht durchbrochen hat; Knötchen in den Knötchen wurden nie beobachtet.

Es traten natürlich sofort und immer wieder Zweifel auf an der Reinheit derselben. Man mufste an eine Symbiose zweier Bakterien in 1 Kolonie denken, wie sie z. B. von M. Neifser[11]

für Xerosekolonien, in denen Influenzabazillenkolonien auftraten, beschrieben worden ist. Diese Vermutung bestätigte sich nicht. Vielmehr müssen wir die Knötchen als eine Eigentümlichkeit der Kolonien unseres Koli ansehen und die Kultur als absolute Reinkultur.

Um sicher eine Reinkultur zu erhalten, verfertigte ich mit aller Sorgfalt Plattenausstriche. Es wurden von einer Endoagarplatte, auf welcher die einzelnen Kolonien gut isoliert liegen, von einer solchen mit der Nadel in Bouillon abgeimpft, die Bouillon wurde kräftig geschüttelt, um die Bakterien gut zu verteilen, dann wurden aus der Bouillon 3 kleine Ösen auf Endoagar übertragen und mit dem von Conradi und Drigalsky zur Untersuchung des Stuhles auf Typhusbazillen empfohlenen Glasspatel auf 3 Endoagarplatten (Dm. 100 mm) zur Verteilung gebracht. Es gelingt auf diese Weise immer, in der 2. oder 3. Platte eine Aussaat zu erhalten, in welcher die Kolonien weit voneinander entfernt liegen. Um auch die Anhänger des Gelatinegufsverfahrens zu befriedigen, gofs ich auch Gelatinesätze, nachdem ich die abgeimpfte Kolonie ebenfalls zuerst in Bouillon durch Schütteln zur Verteilung gebracht hatte. Es gelang mir aber nicht, die Knötchen aus den Kolonien zu entfernen, trotzdem ich, bevor ich zur experimentellen Untersuchung des Bakteriums schritt, nach einigen Vorversuchen eine ununterbrochene Reihe von 8 Endoplattensätzen mit 3 dazwischen eingelegten gegossenen Gelatinesätzen, dabei immer von einzelnen Kolonien ausgehend, verfertigt hatte. Auch fernerhin wurde der Stamm immer durch Plattenverfahren nach Abimpfen von einer Kolonie weiter gezüchtet. Eine ununterbrochene Reihe von 51 Züchtungen, darunter 4 Gelatinesätze, bestätigten zuletzt die schon früher erhaltenen Resultate. Will man also den Glauben an unsere Methode zur Isolierung von Bakterien nicht verlieren, mufs die Kultur als sichere Reinkultur angesehen werden.

Ich bemerke hier ausdrücklich, dafs ausschliefslich dieses Plattenverfahren mit Abimpfung von einer Kolonie verwendet wurde, auch in Nebenversuchen.

Als Tatsachen, welche für die Reinheit der Kultur sprechen, habe ich aber auch noch anderes anzuführen. Ich stellte folgenden Versuch an: Ich impfte einerseits von einer Kolonie, welche ja nach 24 Stunden noch keine Knötchen hat, am ersten Tage ab und strich einen neuen Plattensatz aus; anderseits entnahm ich Material aus der Mitte einer alten, also knötchenhaltigen Kolonie. Das Resultat dieses Versuches war folgendes: Die Zahl der auftretenden Knötchen im neuausgesäten Satze war nur abhängig von der Gröfse der entstehenden Kolonie, dagegen war es ganz gleichgültig, ob in dem verimpften Materiale Knötchen gewesen sind oder nicht. Statt eine ganz junge Kolonie weiter zu impfen, um Material ohne Knötchen zu erhalten, konnte ich auch vom Rande einer alten Kolonie abimpfen, welcher ja auch keine Knötchen besitzt. Der Versuch ergab das gleiche Resultat wie der vorige: Abhängigkeit der Knötchenanzahl in einer Kolonie nur von der Gröfse derselben, nicht aber von dem zur Verimpfung benutzten Material (Rand oder Mitte der Kolonie). Beide Versuchsarten wurden mehrere Male mit dem gleichen Resultat wiederholt. Würde man eine Mischkultur zweier von einander verschiedener Bakterien annehmen, so müfste das Verhältnis zwischen den Kolonien der beiden Bakterien ein anderes sein, wenn einmal nur die eine Art, Abimpfung von einer jungen Kolonie oder vom Rande einer alten, das andere Mal beide Arten, Verimpfung einer alten, ganzen Kolonie, verimpft würden. Entsprechend den vorigen Versuchen, sieht man auch auf der gleichen Platte, auf der ja die beiden Sorten gleichmäfsig verteilt sein müfsten, ein verschiedenes Verhältnis der Menge der Knötchen zu der Menge der als »Amme« dienenden Kolonien. Am Rande der Platte sind wenige grofse Kolonien mit vielen Knötchen, in der Mitte sind viele kleine Kolonien mit wenig oder keinen Knötchen. Auch folgende Tatsache läfst sich noch schwer mit der Annahme zweier symbiotisch miteinander lebenden Bakterien vereinigen. In der Kolonie entstehen, solange sie wächst, neue Knötchen, eines vom anderen getrennt, so dafs z. B. die am 7. Tag entstehenden Knötchen auch bei mikroskopischer Untersuchung keinen Zusammenhang mit den am 3. Tage ent-

standenen haben. Man müfste also für die Knötchenbakterien eine Wanderung innerhalb der Kolonie annehmen, was bei der fehlenden Beweglichkeit der Bakterien nicht sehr wahrscheinlich ist. Morphologische oder färberische Unterschiede zwischen den Bakterien in den Knötchen und denen der übrigen Kolonie habe ich nicht gefunden. Weitere Tatsachen, welche beweisen, dafs wir es mit einer sicheren Reinkultur zu tun haben, ergeben sich im ferneren Verlauf der Arbeit.

Nach dem Gesagten müssen wir es als unbedingt feststehend annehmen, dafs die Kultur eine sichere Reinkultur ist, und daran festhalten, dafs das Interesse der nachfolgenden Beschreibung wesentlich von der Annahme einer Reinkultur abhängt. Untersuchen wir nun die Bedingungen näher, unter denen die Knötchen entstehen. Eine solche habe ich schon erwähnt, die Kolonie mufs ein gewisses Alter haben, sie mufs zum mindesten 2 Tage alt sein, wenn in ihr Knötchen entstehen sollen. Auch dann treten sie in den ältesten Teilen der Kolonie auf, nämlich in der Mitte und am Grunde derselben an der Agaroberfläche. Eine weitere Bedingung ist der Zusatz von Milchzucker zum Nährboden. Die meisten Untersuchungen wurden auf Endoagarplatten gemacht, es genügte aber der Milchzucker allein schon, um Knötchen hervorzurufen, wie zahlreiche Kontrollversuche mit unserem gewöhnlichen 2 proz. Fleischwasseragar bei Zusatz von 1 % Milchzucker beweisen. Endoplatten wurden nur darum vorwiegend zur Untersuchung benutzt, weil sich darauf zu gleicher Zeit die später zu behandelnde Variation bequem untersuchen liefs. Der Prozentgehalt des Milchzuckers konnte bis 0,1 % heruntergesetzt werden, ohne dafs die Knötchenbildnng unterblieben wäre. Allerdings treten die Knötchen bei diesem niederen Prozentgehalt nur in gröfseren Kolonien auf, als bei einem höheren und dann auch spärlicher in der einzelnen Kolonie.

Bei einem Milchzuckergehalt aber von 1 % treten sie in jeder gröfseren Kolonie mit einer solchen Regelmäfsigkeit auf, dafs diese Knötchen als sicheres diagnostisches Zeichen für dieses Bakterium angesehen werden können. Auf anderen als auf

milchzuckerhaltigen Nährböden konnten keine Knötchen erhalten werden. Es wurde untersucht: das Wachstum auf gewöhnlichem neutralen Agar, 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, Traubenzuckeragar, 1% Mannit- und Dextrinagar, Agar mit verschiedenem Karbolsäurezusatz und verschiedener Alkalität, nirgends war auch nur eine Andeutung von Knötchen zu sehen, auch bei viele Tage alten Kolonien. Hierzu ist zu bemerken, dafs bei Mannit- und Traubenzuckerzusatz die Kolonien nur klein bleiben. Man könnte daher annehmen, dafs die Kolonien nicht grofs genug wachsen, um Knötchen zu erhalten; immerhin sind die gröfsten Kolonien auf Traubenzucker- und Mannitagar, welche keine Knötchen zeigen, gröfser als die kleinsten Kolonien auf Milchzuckeragar, welche noch Knötchen besitzen. Das Gleiche gilt für die Kulturen auf karbolhaltigen Nährböden. Bei Agar ohne Zusatz von Zucker und Dextrinagar kann dieser Einwand nicht geltend gemacht werden, da hier, besonders auf Dextrinagar, die einzelnen Kolonien sehr grofs werden. Trotzdem traten nie Knötchen auf.

Ein einziges Mal sah ich auf gewöhnlichem Agar etwas, was bei ganz oberflächlicher Beobachtung für Knötchen hätte gehalten werden können die genauere Betrachtung zeigte aber die völlige Verschiedenheit von diesen Es handelte sich damals um eine gewöhnliche Agarplatte, welche mit diesem Koli geimpft und bei einer Temperatur von 42° gehalten wurde. Nach 10 Tagen ging eine vorgenommene Abimpfung von einzelnen Kolonien nicht mehr an. Die Platte blieb darauf 2 Tage auf dem Arbeitsplatze liegen, am 3. Tage bemerkte ich bei ganz wenigen Kolonien auf einer Seite der Platte Auswüchse, welche zu Beginn als Knötchen imponierten, die sich aber später als nichts anderes als wieder zu Kolonien auswachsende Bakterien bei Abgestorbensein der übrigen Kolonie erwiesen. Die entstehenden Gebilde waren auch nicht kugelig wie die Knötchen, sondern flach, sie entstanden nicht in der Mitte der Kolonie sondern am Rande derselben. Ich hatte diese Platte eben gerade zu der Zeit aus dem Brutschranke genommen, da die Mehrzahl der Bakterien abgestorben war, und nur eine ganz geringe Zahl von Bakterien am Leben waren. Die ersten Kontrollimpfungen hatten zufällig nur tote Kolonien getroffen. Später vorgenommene Kontrollen zeigten, dafs zwar die Abimpfung von der Kolonie keinen Erfolg hatte, dafs aber eine solche von den Auswüchsen auf Endoagar typische Kolonien entstehen liefs. Dem nächsten Abschnitt vorgreifend, will ich hier schon erwähnen, dafs aus den Auswüchsen dieser Agarplatte keine rotweifsen Sätze entstanden, trotzdem am 3. und 8. Tage, nachdem sie bemerkt wurden (die Kolonie war schon 13 resp. 18 Tage alt), abgeimpft wurde, zu einer Zeit, wo bei echten Knötchen auf Milchzucker schon längst rotweifse Platten entstanden wären.

Diese Auswüchse sind also nicht mit den Knötchen zu identifizieren, sondern als Wiederaufleben einiger Bakterien in einer sonst toten Kolonie anzusehen.

Die Knötchen entstehen also nur bei Zusatz von Milchzucker zu dem Nährsubstrat.

Bei anderen Bakterien als bei unserem Bacterium coli habe ich Ähnliches nicht bemerken können. Eine grofse Zahl der daraufhin untersuchten Bakterien, besonders aus der Typhus-Koli-Gruppe, konnte lange (bis 14 Tage) beobachtet werden, es entstanden nie solche Gebilde wie die Knötchen. Meine Untersuchungen erstreckten sich auf 9 den Milchzucker nicht vergärende, zur Koligruppe gehörende Arten, auf eine grofse Anzahl typischer Koli, auf fünf Typhusstämme, 4 Paratyphusstämme, 3 Dysenterien vom Typus Flexner, 1 Dysenterie vom Typus Shiga, 2 Proteusarten, 1 Alkaligenesstamm, einige Staphylokokken und Streptokokkenstämme und auf Milzbrand. Man findet zwar in sehr alten, fast vertrockneten Kolonien zuweilen ganz kleine Erhabenheiten, welche entfernt an Knötchen erinnern. Diese treten aber stets sehr spät und unregelmäfsig auf, sie sind zudem kleiner und haben Übergänge zu den unbedeutendsten Unebenheiten in der Kolonie, mit den Knötchen können sie nicht verwechselt werden.

Auch die neulich von Eisenberg[5]) beschriebenen sekundären Tiefenkolonien haben mit den Knötchen unseres Koli gar nichts gemein. Jene wachsen im Agar, bleiben also beim Entfernen der Kolonie mit dem Spatel bestehen, diese wachsen in der Kolonie selbst, und werden beim Versuch, die Kolonie von der Agarfläche abzuschaben, mitgenommen. Jene treten besonders schön bei Serumzusatz, nicht aber bei Zusatz von Milchzucker, diese nur bei Zusatz von Milchzucker auf und fehlen vollständig bei Zusatz von Kaninchenserum in verschiedener Konzentration (1%, 2,5%, 5%) vollständig. Eisenbergs Granulationen sind klein, mit blofsem Auge kaum sichtbar, die Knötchen aber sind ohne Mühe mit blofsem Auge schon aus einer gröfseren Entfernung zu sehen.

Etwas mehr äufserliche Ähnlichkeit haben die von Preisz[13]) beim Milzbrand beschriebenen »sekundären Kolonien«. Es sind dies durchscheinende Knötchen, welche nach Preisz aus resistenteren, teilweise auch anders geformten Bakterien und Sporenanhäufung bestehen. Diese Knötchen beim Milzbrand treten auch auf gewöhnlichem Agar auf. Eine Sporenbildung habe ich nun bei unserem Bacterium coli nie beobachtet. Dasselbe wird bei 80° prompt abgetötet. Um aber mögliche feinere Unterschiede in der Resistenz der Bazillen in den Knötchen und denen der Kolonien ohne Knötchen auszuschliefsen, machte ich folgenden Versuch. Es wurde einerseits eine knötchenhaltige, anderseits eine zweitägige knötchenfreie Kolonie in Bouillon aufgeschwemmt und dann in kleine Fläschchen verteilt. Diese wurden verkorkt, versiegelt, dann wurde von jeder Art je ein Fläschchen in Wasserbäder von 50°, 55°, 60°, 65° und 70° versenkt, so dafs sie ganz von dem warmen Wasser umgeben waren. Die Dauer der Erwärmung betrug $^1/_2$ Stunde. Darauf wurde von den Fläschchen auf Endoagar abgeimpft und der Rest der Fläschchen in dem Brutschrank bei 37° bis zum anderen Tage aufgehoben. Die Prüfung ergab übereinstimmend auf dem Agar und in den Fläschchen, dafs eine Temperatur von 50° $^1/_2$ Stunde von knötchenfreien und knötchenhaltigen Kolonien noch ertragen wurde, dafs aber 55° genügten, um die Bakterien in $^1/_2$ Stunde abzutöten. Ein zweiter Versuch mit feineren Schlägen 50°, 53°, 56°, setzte die in $^1/_2$ Stunde abtötende Temperatur für beide Arten der Kolonie auf 53° fest. Also auch die beim Milzbrand auftretenden Knötchen haben in ihrem Wesen nichts mit den im ersten Teil dieser Arbeit beschriebenen Knötchen zu tun.

Auch in der übrigen mir zugänglichen Literatur fand ich nirgends Angaben über ein ähnliches Verhalten einer Kolonie.

Eine Aufklärung über das Wesen dieser Knötchen werde ich später geben. Fassen wir einstweilen folgende Tatsachen zusammen:

I. Die weifsen Kolonien zeigen ausnahmslos, wofern sie am Rande der Platten liegen, oder sonst nicht zu zahlreich auf den Platten sind, vom 2. Tage an die Knötchenbildung.

II. Diese Knötchenbildung tritt ausschliefslich auf milchzuckerhaltigen Nährböden auf.

III. Ein Milchzuckergehalt von 0,1% genügt, um die Knötchenbildung auftreten zu lassen.

IV. Die Farbe der Knötchen kann weifs oder rot sein. Im allgemeinen treten zuerst weifse Knötchen auf, welche allmählich rot werden.

V. Die Knötchenbildung beginnt frühestens am 2. Tage und nimmt mit dem Alter der Kolonie dauernd zu.

VI. Die Knötchenbildung konnte nur bei unserem Bacterium coli konstatiert werden. Sie fehlt bei anderen Bakterien der Koli-Typhus- und anderer Gruppen. Auch die von Eisenberg beschriebenen Granulationen und die von Preisz beim Milzbrand beschriebenen sekundären Kolonien haben nichts mit unserer Knötchenbildung zu tun.

Anschliefsend an das merkwürdige Wachstum des Koli auf Milchzuckernährböden, möchte ich hier die übrigen morphologischen und kulturellen Eigenschaften des Koli anführen.

Das Bakterium ist ein kurzes, ganz wie das typische Bacterium coli commune aussehendes Stäbchen mit etwas abgerundeten Ecken, nach Gram entfärbt es sich prompt. Beweglichkeit konnte nicht nachgewiesen werden. Polkörperchen und Sporen wurden nicht gebildet.

Auf Schrägagarröhrchen wächst es als üppige koliartige Kultur, schwach irisierend, mit leicht gelblichgrauem Farbenton. Die einzelnstehenden Kolonien sind rund, ohne besondere Zeichnung oder Körnelung.

Auf Traubenzucker und Mannitagar bleiben die Kolonien, wie schon gesagt, erheblich an Gröfse hinter denen auf anderen Nährböden zurück. Sie sterben da auch innerhalb 4—6 Tagen ab.

Auf Dextrinagar wächst das Bakterium leicht und bildet grofse, runde flache Kolonien.

Das Wachstum auf Conradi-Drigalsky-Agar entspricht dem auf dem Endoagar.

In Bouillon entsteht eine allgemeine Trübung, nach 2 Tagen beginnt ein Bodensatz zu entstehen, keine Kahmhaut.

Die Milch wird nach 8—15 Tagen zur Gerinnung gebracht.

Die Petruschkysche Lackmusmolke wird am 1. Tag schwach gerötet und eine Spur trüb. Am 2. Tage zeigt sie deutliche Rötung und Trübung. Dieses Aussehen bleibt bestehen, auch nach einem Monat tritt kein Farbenumschlag auf.

In »Traubenzucker hohe Schicht«[1]) verimpft, entsteht starke Gasentwicklung.

In »Milchzucker hohe Schicht« ist das Verhalten verschieden, je nachdem eine eintägige nicht knötchenhaltige Kolonie oder eine mehrtägige knötchenhaltige verimpft wird. Im ersten Falle

1) Um Bakterien auf ihr Vergärungsvermögen von Zuckerarten zu prüfen werden dieselben in »hohe Schichten« von flüssig gemachten und auf 40° C abgekühlten Agar (1% Traubenzucker resp. Milchzucker) verimpft. Gründliches Umschütteln, Erstarrenlassen.

Wo es sich um schnelle Diagnose handelt, z. B. um Identifizierung von Typhusbazillen aus dem Stuhl, wird im Laboratorium von Prof. M. Meisser die mit einer typhusverdächtigen Kolonie geimpfte »Milchzucker-hohe-Schicht« nach dem Erstarren noch mit ca. 3 cm neutraler Bouillon überschichtet. Bestand die verdächtige Kolonie aus Typhusbazillen, so wachsen sie in die Bouillon hinein und machen sie vollständig trüb; die »hohe Schicht« selbst ist ganz von Typhusbazillen durchwachsen und leicht getrübt (Säurebildung).

Auch zur Paratyphusdiagnose ist die Milchzucker-hohe-Schicht geeignet. Im gewöhnlichen Agar, also auch im Milchzuckeragar, finden sich stets Spuren von Traubenzucker. Vergärung von diesen Spuren von Traubenzucker führt nie zu einer vollständigen Zerreifsung des Agars, sondern nur zu einer gröfseren Anzahl kleinerer Gasblasen, ohne dafs die Agarsäule zerrissen wird. Dieses Bild des von vielen kleinen Gasblasen durchsetzten Milchzuckeragars ist recht charakteristisch für die Paratyphusgruppe und für die übrigen Traubenzuckervergärer, die Milchzucker nicht vergären.

Im Gegensatz hierzu zerreifsen die Milchzucker vergärenden Koliarten den Milchzuckeragar vollständig. Anderseits rufen Typhus- und Dysenteriebazillen, die ja weder Milchzucker noch Traubenzucker vergären, gar keine Gasblasen in dem Milchzucker hervor.

Aufser dem Auftreten von Gasblasen ist aber, wie bemerkt, darauf zu achten, ob Wachstum in der ganzen »hohen Schicht« und Trübung des Agars auftritt (Typhus, Paratyphus, Dysenterie). Auch die Bouillon mufs bei diesen drei Arten vollständig getrübt sein. Der hängende Tropfen zeigt die typischen Merkmale, das gefärbte Präparat zeigt gram-negative Stäbchen. Alsdann läfst sich mit einem Teile der Bouillon (nach Abimpfung einer Öse auf schrägen Agar zur Konservierung der Kultur) die Indolreaktion und mit dem Rest eine probatorische makroskopische Agglutination anstellen (Zusatz einiger Tropfen entsprechenden Serums in einer Verdünnung 1 : 100).

entstehen kleine Blasen im Milchzucker wie beim Paratyphus. Im zweiten aber wird der Milchzucker total auseinandergerissen. Wir kommen auf dieses verschiedene Verhalten später noch zu sprechen.

Der Gelatinestich zeigt sich als weifser, scharf begrenzter Strang. Die Gelatine wird nicht verflüssigt.

In der gegossenen Agarplatte haben die Kolonien Linsenform, in deren Mitte einen Nabel.

In gegossenen Gelatineplatten zeigen die Kolonien eine leichte rosettenförmige Zeichnung. Die oberflächlichen sind rund, flach, ohne Zeichnung. Die Farbe ist leicht gelblich.

Sämtliche Kulturen sind beinahe geruchlos.

Indolbildung konnte nie nachgewiesen werden (Ehrlichsche Indolreaktion).[2]) Das Koli reduziert Methylenblau nach der von M. Neifser und Wechsberg angegebenen Methode.

In Barsiekowschen Nährböden verhielt sich das Bakterium folgendermafsen: Die mit Polysacchariden, Dextrin und Inulin versetzten Nährböden wurden nicht verändert. Von den Disacchariden wurden Rohrzucker nicht zersetzt, bei Zusatz von Maltose entstand Rötung und Gerinnung in den Reagensröhrchen. Auf Laktose hatte das Koli auch in den Barsiekow-Nährböden einen verschiedenen Einflufs, je nachdem junge knötchenlose oder alte knötchenhaltige Kolonien verimpft wurden. Im ersten Falle blieb die Farbe unverändert und das Röhrchen klar, im letzteren entstand Rötung und Gerinnung. Bei allen anderen Zusätzen zu Barsiekow-Nährböden war es gleichgültig, ob knötchenlose oder knötchenhaltige Kolonien verimpft wurden. Von Monosacchariden wurde Galaktose und Dextrose untersucht, in beiden entstand Rötung und Gerinnung, bei Traubenzuckerzusatz schon am 1. Tage, bei Zusatz der übrigen Zuckerarten erst am 2. Tage, wenn dies überhaupt zu sehen war. Beim Mannitzusatz trat Rötung und Gerinnung auf.

Auf das Verhalten den Tieren gegenüber komme ich am Schlusse dieser Untersuchung zu sprechen.

Ob das Koli die Ursache der Erkrankung des Patienten gewesen ist, läfst sich nicht entscheiden. Blut zur Agglutination

konnte wegen des kurzen Spitalaufenthaltes nicht erhalten werden und in seither untersuchten Stühlen habe ich nie mehr ein Bakterium gefunden, welches mit dem meinigen identisch gewesen wäre.

B. Die Mutation.

Die zweite Eigenart unseres Bakteriums besteht darin, dafs nicht alle Keime zu gleichmäfsigen Kolonien auswachsen, sondern dafs unter bestimmten Bedingungen einzelne Keime variieren und ihre neu erhaltene Eigentümlichkeit sofort konstant weiter vererben. Wird das Koli auf Endoplatten weiter gezüchtet, so dafs der neue Satz immer von einer isolierten Kolonie des vorhergehenden Satzes ausgeht, so sieht man nach einigen Umzüchtungen neben den weifsen Kolonien rote auftreten.[1]) Diese letzteren sind nach 16 Stunden nicht von den früher beschriebenen farblosen Kolonien zu unterscheiden, nach 18—20 Stunden aber erhalten sie einen roten Nabel und nach 36—48 Stunden sind sie ganz rot und zeigen den für das Bacterium coli commune typischen metallischen grünen Fuchsinglanz. Am 2. und 3. Tage sind sie durchschnittlich gröfser als die weifsen Kolonien, bleiben aber in den nächstfolgenden Tagen an Gröfse hinter den letzteren bedeutend zurück. Die roten Kolonien erhalten nie Knötchen, wie ich sie im ersten Teil der Arbeit als für die weifsen Kolonien charakteristisch beschrieben habe. Wird nun von einer roten Kolonie wieder abgeimpft, und ein neuer Endosatz ausgestrichen, so entstehen nur rote Kolonien, keine einzige weifse, und auch bei weiterer Verimpfung bleiben alle folgenden Generationen rein rot, es gelingt nie mehr, auf Endo eine weifse Kolonie zu erhalten.

Anders dagegen verhält sich die Sache bei Verimpfung einer weifsen Kolonie. Hier können nach einiger, meist kurzer Zeit,

1) Ich werde im folgenden der Kürze halber oft von weifser und roter Kolonie sprechen. Es sind dann damit jeweils die im ersten Teile beschriebenen farblosen Kolonien resp. die im zweiten Teile untersuchte Varietät gemeint; auch rote oder weifse Bakterien sind solche, welche, wenn sie auf Endonährboden gebracht werden und zur Vermehrung kommen, zu einer roten resp. weifsen Kolonie auswachsen.

neben den weifsen Kolonien wieder rote auftreten, welche wiederum bei weiteren Verimpfungen rot bleiben. Die weifsen Kolonien behalten auch auf rotweifsen Platten neben den roten Kolonien ihr typisches Verhalten bei und erhalten vom 3. Tage an Knötchen. Es gelingt also durch Züchtung auf Endonährboden, aus einer weifs wachsenden Form nach Belieben eine rot wachsende und rot bleibende zu erhalten. Das Experiment aus weifs wachsenden Kolonien rote zu erhalten, kann beliebig oft wiederholt werden. Ich habe diese Erscheinung $^1/_2$ Jahr lang mit absoluter Regelmäfsigkeit auftreten sehen. Der beigefügte Stammbaum unseres Koli zeigt dies zur Genüge.

Um entscheiden zu können, ob es sich um eine Platte mit nur roten oder nur weifsen oder um eine solche mit roten und weifsen Kolonien handelt, bedarf es gut ausgestrichener Plattensätze. Denn bei sehr dicht stehenden Kolonien tritt nur einerlei Farbe auf, diejenige der Majorität hat das Übergewicht. So können in dichtbesäten Platten z. B. einige rote Kolonien in einer Überzahl weifser ganz übersehen werden, da die umstehenden weifsen Kolonien durch Diffusion das Rotwerden der roten verhindern. Würde dagegen eine solche rote Kolonie isoliert zum Wachsen kommen, so hätte sie den typischen Fuchsinglanz. Auf die im ersten Teile beschriebene Art aber gelingt es leicht, solche Plattensätze zu erhalten, auf welchen die roten und weifsen Kolonien deutlich voneinander zu unterscheiden sind, auch wenn beide nicht in einem gleichen Verhältnis zueinander stehen. Es schadet dann auch nichts, wenn einige Kolonien bei ihrem späteren Wachstum aneinander stofsen und sich gegenseitig an ihrer Vergröfserung behindern. Man sieht trotzdem deutlich zweierlei Arten von Kolonien, welche durch eine scharfe Linie voneinander getrennt sind, so z. B. zeigen eine rote und eine weifse oder zwei weifse eine rote Kolonie deutlich ihre Farbe oder ihre Knötchen. Die Fig. 2 zeigt schematisch einige Formen zweier oder mehrerer nebeneinander liegender Kolonien, wie sie häufig gefunden werden Auch zwei weifse, in ihrem späteren Wachstum zusammentreffende Kolonien sind meist durch eine scharfe, gut sichtbare Linie voneinander getrennt.

Es versteht sich von selbst, daſs bei der prinzipiellen Bedeutung der Versuche nie nur ein einziger Versuch angestellt wurde, sondern daſs dieser immer ein oder mehrere Male wiederholt wurde. Auch habe ich die eingehenderen Untersuchungen über die Variation erst begonnen, als ich meine Kultur mit absoluter Sicherheit als Reinkultur ansehen durfte.

Sehen wir nun zu, unter welchen Bedingungen die Aberration entsteht oder nicht zustande kommt. Nehmen wir eine weiſse Platte an, so erhalten darauf die Kolonien frühestens am 2. Tage Knötchen, sie werden gröſser, erhalten neue Knötchen, weiſse und rote, alle Kolonien auf dieser Platte bleiben aber weiſs, auch wenn sie 14 Tage lang wachsen. Eine Kolonie, welche sich einmal als weiſse manifestiert hat, bleibt weiſs; ich habe nie ein Verlorengehen der Knötchen oder ein spätes Rotwerden einer weiſsen Kolonie gesehen.

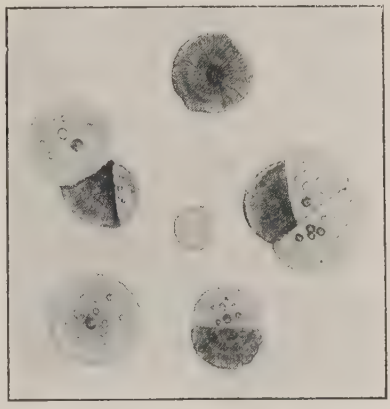


Fig. 2.

Impft man nun am ersten Tage eine Kolonie ab und streicht mit deren Bouillonaufschwemmung einen neuen Endosatz aus, so entsteht wieder eine weiſse Platte, welche wiederum frühestens am 2. Tage Knötchen erhält und weiſs bleibt.

Diese tägliche Abimpfung von einer weiſsen Platte habe ich 20 mal hintereinander gemacht, ohne daſs jemals eine rote Kolonie neben den weiſsen entstanden wäre. Alle Kolonien bekommen Knötchen und bleiben weiſs, es gelingt also eine weiſse Kultur auf Endoagar weiſs weiter zu züchten.

Lassen wir aber unsere erste Platte, von der die ganze Reihe ausgegangen ist, 4 Tage im Brutschrank stehen und impfen dann ab, so erhalten wir auf der nun ausgestrichenen Endoplatte rote Kolonien neben den weiſsen. Wir erhalten also bei Abimpfung am ersten Tage einen weiſsen, am 4. aber einen

rotweifsen Plattensatz, trotzdem die Mutterkolonie weifs geblieben war und weifs bleibt. Das gleiche Resultat können wir mit allen 20 Platten, welche durch tägliche Abimpfung entstanden sind, erhalten. Jede einzelne gibt einen rotweifsen Tochtersatz, wenn erst nach 4 Tagen abgeimpft wird, trotzdem sie selbst weifs bleibt.

Wir kennen also hieraus schon eine wesentliche Bedingung, welche zur Bildung der Variation nötig ist: Die Kolonie mufs ein gewisses Alter haben. Diese Zeit, welche vergehen mufs, bis eine Abimpfung einen rotweifsen Plattensatz gibt, ist nicht konstant. Während im März 1906 die Abimpfung am 3. oder 4. Tage regelmäfsig zu einem rotweifsen Endosatz führte, konnte im Oktober 1905 ein Neuausstrich von Platten, welche am 5. Tage abgeimpft wurden, noch rein weifse Töchtersätze zur Folge haben, einmal sogar entstand noch bei Abimpfung am 8. Tage ein weifser Endosatz. Im allgemeinen ist es aber so, dafs die mit Knötchen versehenen Kolonien bei Verimpfung rotweifse Endosätze bilden. Ich werde später noch einmal hierauf zu sprechen kommen.

Die zweite Bedingung, welche zum Auftreten von roten und weifsen Kolonien auf der Endoplatte nötig ist, ist das Vorhandensein von Milchzucker im Nährboden. Die Rotweifsbildung wurde, wie die Knötchen, zuerst auf Endoagar beobachtet Sie verläuft aber ganz parallel auf dem Conradi-Drigalsky-Nährboden, auch auf gewöhnlichem Milchzucker tritt die Variation auf. Als Kriterium der weifsen Kolonien müssen, da auf gewöhnlichem Agar die Farben fehlen, das Auftreten der Knötchen resp. das Fehlen derselben nach dem 3. Tage angenommen werden. Angestellte Kontrollimpfungen ergaben, dafs dies erlaubt ist. Abimpfungen von knötchenhaltigen Kolonien von Milchzuckeragar auf Endoagar ergab weifsrote Plattensätze; bei Abimpfungen von knötchenlosen Kolonien erhielt man dagegen stets einen rein roten Plattensatz, ein Beweis dafür, dafs die Mutterkolonie schon einer auf Endo rot wachsenden Kolonie entsprochen hat. Natürlich müssen zu diesen Versuchen alleinstehende, grofse Kolonien gewählt werden, da ja in kleinen überhaupt keine Knötchen auftreten. Ebensowenig wie die Knötchen, konnte die

Variation auf einem anderen als auf einem Milchzuckernährboden erhalten werden. Die weifse Form des Koli läfst sich auf gewöhnlichem Agar monatelang fortzüchten, sie wird nie zu einer roten. Auch auf Mannit-, Traubenzucker- und Dextrin-Agar wurde die Erhaltung einer Variation versucht, auch hier vergeblich. Von Dextrinagar impfte ich von einer 14 Tage alten alleinstehenden grofsen Kolonie ab, ohne eine Variation zu erhalten.

Da man an die Möglichkeit denken konnte, dafs die rote Modifikation eine Degenerationsform der weifsen sei, so versuchte ich durch Schädigung einer weifsen Kultur eine rotweifse zu erhalten. Ich liefs daher Agarsätze in einem auf 42° eingestellten Brutschrank wachsen; nach 6 Tagen waren sie noch rein weifs, wie ich mich durch eine Kontrolle vergewisserte. Die längere Züchtung im 42° Brutschrank gelang nicht, da die Kultur so geschwächt war, dafs sie nicht mehr anging. Ein zweiter Versuch mit 41° ergab das gleiche Resultat bei einer Dauer von 19 Tagen.

Da Schierbeck gezeigt hatte, dafs Milchsäurebakterien durch Karbolsäurezusatz ihr Säuerungsvermögen dauernd vermindern können, probierte ich, ob nicht die rote Form durch Karbolzusatz zum Agar hervorgerufen werden könne. Es wurden nach Schierbeck 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 ccm einer 3proz. Karbolsäure zu 15 ccm Agar gebracht und auf den damit gegossenen Platten unser Bakterium ausgestrichen. Auf den beiden Karbolagarplatten mit 0,8 und 1,6 ccm Karbolsäure zu 15 ccm Agar wuchs das Bakterium überhaupt nicht, dagegen liefs es sich bei schwächeren Konzentrationen weiter züchten. Die Kultur war im ganzen 17 Tage lang auf Karbolnährboden gewachsen, ohne die Variation gebildet zu haben. Auch dieser Versuch wurde wiederholt. Das gleiche negative Resultat gab eine Züchtung auf Nährboden mit verschiedenem Alkali- oder Säuregehalt.

Bei der Tierpassage wurde, wie zu erwarten stand, da das Koli als weifse Modifikation gezüchtet wurde, die rote Abart nicht gebildet. Es wurde ein Meerschwein durch Intraperitonealinjektion getötet und aus dem Exsudat die Bazillen auf Agar wieder herausgezüchtet. Damit wurde wieder ein Meerschwein intra-

peritoneal geimpft und dieser Versuch viermal wiederholt. Aus dem letzten Meerschwein wurde wieder auf Endoagar gezüchtet, es zeigte sich, dafs noch keine roten Bakterien aufgetreten waren[1]). Die auf Endo entstandene rote Abart zeigt in allem übrigen kulturell und morphologisch die gleichen Eigenschaften wie sie Seite 26 für die weifse Kolonie beschrieben worden sind. Nur in allen Nährböden mit Milchzuckerzusatz zeigt sich eine Differenz zu den letzteren. Das weifse Koli, in hohe Schicht verimpft, zeigt nur ganz kleine Bläschen, die rote Abart dagegen zersetzt den Milchzuckeragar in hoher Schicht vollständig wie das Bacterium coli commune. Analog verhält sich der Unterschied in Barsiekowschen Nährböden mit Milchzuckerzusatz. Hier bleibt das mit einer weifsen Kolonie geimpfte Röhrchen klar, wird höchstens nach 4—5 Tagen ganz schwach gerötet, während in dem mit einer roten Kolonie geimpften Röhrchen schon am 2. Tage Gerinnung und starke Rötung auftritt. Aus diesem Verhalten der roten Kolonien und aus dem Zusammenhang dieser mit dem Knötchen erklärt sich auch leicht der auf Seite 28 beschriebene Unterschied zwischen knötchenfreien und knötchenhaltigen Kolonien in Milchzuckernährböden. Dafs das rote Bakterium auf Conradi-Drigalsky-Agar analog dem Wachstum auf Endoagar ebenfalls rot wie das Bacterium coli commune wächst, ist selbstverständlich.

Die Fähigkeit, Milchzucker anzugreifen, behält das Bakterium auf allen gebräuchlichen Nährböden und den mit dem auf Seite 26 beschriebenen Zuckerarten versetzten Agarplatten bei. Auch

1) In allen Fällen, in denen das weifse Koli einige Zeit auf anderen als Endonährböden gezüchtet oder unter andere Bedingungen gebracht wurde, wurde dasselbe nach Beendigung des Versuchs zur Kontrolle wieder auf Endoagar zurückverimpft. In allen Fällen traten, wenn das Koli weifs geblieben war, nach 2—4 Tagen in diesen zurückgeimpften Kolonien wieder Knötchen auf, eine dann von dieser Kontrollplatte vorgenommene Abimpfung hatte wieder eine Rotweifs-Bildung zur Folge. Das wieder auf Endoagar zurückgeimpfte Bakterium verhielt sich dann ganz so, wie es sich vor seiner experimentellen Übertragung auf einen anderen Nährboden verhalten hatte. War dagegen eine Variation zu Rot eingetreten, wuchsen auf dem zur Kontrolle dienenden Endosatz auch rote, bei weiterer Verimpfung rot bleibende Kolonien.

nach langer Züchtung ohne Milchzucker wächst die rote Variation, auf Endo gebracht, sofort wieder rot.

Als Hauptsätze dieses zweiten Abschnittes fasse ich folgende Thesen zusammen:

VII. Läfst man eine Milchzucker enthaltende Platte mit nur weifsen Kolonien beliebig lange stehen, so entstehen in der weifsen Kolonie wohl Knötchen, aber es wird niemals aus einer weifsen Kolonie eine rote.

VIII. Wird von einer solchen weifsen und sicher weifsbleibenden Kolonie innerhalb der ersten 24 Stunden abgeimpft, so entstehen Platten mit nur weifsen Kolonien, welche Knötchen erhalten und mit Sicherheit weifs bleiben. Diese Abimpfung von weisfen und weifsbleibenden Kolonien innerhalb 24 Stunden des Wachstums kann beliebig oft fortgeführt werden, ohne dafs jemals andere als weifse, späterhin Knötchen zeigende Kolonien auftreten.

IX. Wird aber von einer solchen Platte nach dem 2. Tage abgeimpft, so entstehen mit absoluter Regelmäfsigkeit Platten mit weifsen und roten Kolonien. Das Auftreten von weifsroten Platten kommt gewöhnlich erst bei Abimpfung von 4—5 Tagen alten Kolonien vor, seltener bei 3 tägigen. Dafs in sehr seltenen Ausnahmefällen bei Abimpfung von zweitägigen Kolonien rotweifse Platten entstehen, beweisen 2 unter einer grofsen Anzahl von Versuchen vorgekommene Fälle.

X. Abimpfung von einer roten Kolonie, gleichgültig in welchem Stadium sie erfolgt, ergibt ausnahmslos rote Kolonien.

XI. In roten Kolonien ist niemals eine Knötchenbildung zu sehen.

XII. Wird eine eintägige weifse Kolonie auf irgendeinen anderen nicht Milchzucker haltigen Nährboden verpflanzt, und zwar ebenfalls in Form des Plattenausstriches, so können diese viele Tage lang stehen, ohne dafs bei der

Rückimpfung auf Endoagar rote Kolonien entstehen. Es bleiben vielmehr alle Kolonien dauernd weifs. (Eine Abimpfung von diesen zurückverimpften Kolonien nach dem 3. Tage ergibt natürlich wieder weifsrote Platten.)

XIII. Die rote Variation behält ihre Eigenschaften auch bei, wenn sie auf nicht Milchzucker haltigen Nährböden gezüchtet wird.

C. Das Verhalten der Knötchen zur Mutation.

Vergleichen wir das Auftreten der Variation mit dem der Knötchen, so fällt uns sofort die grofse Übereinstimmung in den Bedingungen, welche zu deren Entstehung nötig sind, auf. Beide brauchen einige Zeit bis zu ihrer Bildung, beide entstehen nur auf Zusatz von Milchzucker zu den Nährböden. In der Tat können die Knötchen als rote Kolonien in den weifsen angesehen werden. Dafs die Knötchen auch weifs sein können, spricht nicht gegen diese Auffassung. Denn, wie schon früher bemerkt, kann eine Überstimmung der roten Kolonien durch ein Übergewicht der weifsen stattfinden. Auch dem Einwand, dafs die Knötchen darum keine roten Kolonien sein können, weil es vorgekommen ist, dafs Abimpfungen am 5. Tage trotz Vorhandenseins von Knötchen nur weifse Kolonien entstehen liefsen, läfst sich leicht begegnen. Auf einer schön ausgestrichenen Platte haben nur ca. 500 Kolonien Platz, wenn sie nicht gegenseitig aneinanderwachsen sollen. Ist nun das Verhältnis der roten Bakterien zu den weifsen in einer Kolonie gröfser als 1 : 500, so ist es klar, dafs Platten entstehen können, auf welchen nur weifse Kolonien wachsen, trotzdem auch rote in dem zur Impfung benutzten Material waren. Dafs das Verhältnis zwischen roten und weifsen gröfser sein kann als 1 : 500, läfst sich leicht denken, gibt es doch Kolonien mit sehr wenig Knötchen, und kommen doch am Rande der Kolonien, der einen grofsen Teil der Gesamtmasse derselben ausmacht, keine Knötchen vor. Dafür, dafs die Knötchen rote Kolonien sind, sprechen noch andere Beobachtungen. Bei den zwei schon früher erwähnten Ausnahmen, in denen

die Abimpfung schon am zweiten Tage zu rotweifsen Platten führte, traten ausnahmsweise auch die Knötchen schon so früh auf.

Auch folgende zwei Versuche beweisen, dafs zum Auftreten der Variation Knötchen verimpft werden müssen. Den einen erwähnte ich schon. Es handelt sich um die tägliche Verimpfung von weifsen Kolonien, hier gab es keine Knötchen und keine Variation. Ein paralleler Versuch ist folgender: Statt eine junge eintägige Kolonie ohne Knötchen abzuimpfen, wird sehr sorgfältig vom Rande einer alten Kolonie abgestochen, ohne ein Knötchen mitzunehmen. Es gelingt so ebenfalls, nur weifse Sätze weiter zu züchten. Wenn keine Knötchen mitverimpft werden, tritt also keine Variation auf. Wird anderseits möglichst nur von Knötchenmaterial zu einer neuen Aussaat genommen, so erhält man fast rein rote Platten. Die wenigen weifsen Kolonien entstehen aus mitgerissenen Partikeln der weifsen Kolonie, da es praktisch nicht möglich ist, nur von Knötchen stammendes Material zu erhalten. Je sorgfältiger aber von Knötchen abgeimpft wird, desto eher entstehen Plattensätze mit nur roten Kolonien; dabei ist es gleichgültig, ob rote oder weifse Knötchen verimpft werden. Auch die weifsen Knötchen sind variierte Bakterien, nur wird hier das Freiwerden des Fuchsins durch einen von der übrigen Kolonie gebildeten Stoff verhindert. Sobald diese weifsen Knötchen aber abgestochen und zu einer weiteren Aussaat verwendet werden, entsteht ein rotweifser Plattensatz, auch hier mit um so weniger weifsen Kolonien, je sorgfältiger nur von Knötchen abgeimpft wurde.

Die Knötchen sind also rote Kolonien, welche in weifsen entstehen. Die Variation entsteht daher nicht bei der Aussaat einer neuen Kultur, sondern in schon einige Zeit gewachsenen Kolonien und zwar in den ältesten Teilen, Mitte der Kolonie und gegen die Agarfläche zu. Die Beeinflussung durch eigene Sekrete der Bakterien scheint demnach zur Entstehung der Variation nötig zu sein.

Die Variation, welche sich durch Auftreten der Knötchen bemerkbar macht, tritt plötzlich auf. Die neu entstehenden roten Bakterien unterscheiden sich sofort deutlich von den alten

weifsen durch ihre Fähigkeit, Milchzucker unter Gasbildung zu zersetzen. Es fragt sich nun, wie fest wird diese neue Fähigkeit beibehalten? Wie ich schon Seite 34 bemerkte, wächst ein einmal rot gewordenes Bakterium auf allen gebräuchlichen Nährböden als rotes. Aber nicht nur auf diesen, sondern auch bei Zusatz von schädigenden Stoffen geht diese Fähigkeit nicht verloren. Es gelang mir nur ein einziges Mal, aus einer roten Kolonie wieder weifse zu erhalten. Als wichtigen Versuch beschreibe ich ihn etwas ausführlicher.

Von einer weifsroten Platte wurde eine junge rote Kolonie entnommen und in Bouillon aufgeschwemmt. Von dieser gleichen Bouillon wurden je drei Ösen auf Agarplatten mit Karbolzusatz und auf solchen mit verschiedenen Alkalitäts- und Säuregraden ausgestrichen. Der Karbolgehalt wurde so stark als möglich gewählt, so dafs das Koli eben noch darauf zum Wachstum kam, nämlich 0,3 einer 3 proz. Karbolsäure auf 15 ccm Agar. Als Agar mit verschiedener Reaktion wählte ich einen gegen Lackmus leicht sauer resp. leicht alkalisch reagierenden Nährboden. Zur Kontrolle wurden drei Ösen dieser gleichen Bouillon auf Platten mit gewöhnlichem Agar zur Verteilung gebracht. Alle Platten wurden am 14. II. ausgestrichen. Am 19. II. wurden von jeder Platte einige Kolonien in Bouillon aufgeschwemmt und damit wieder Plattensätze ausgestrichen, natürlich die Kolonien, welche auf Karbolagar gewachsen waren, wieder auf Karbolagar etc. Es wurden ausnahmsweise einige Kolonien miteinander abgeimpft, da man ja nicht wissen konnte, welche der Kolonien event. weifs geworden sein könnte, da die weifse Art auf Karbolnährböden ja gleich wächst wie die rote. Wenn ich daher viele Kolonien abimpfte und zur neuen Aussaat verwendete, hatte ich eher die Möglichkeit, eine weifse unter den roten zu finden.

Am 1. III. wurden von der karbolhaltigen Platte mehrere Kolonien abgestochen und mit einer Öse nebeneinander auf Endoagar ausgestrichen. Diese Kulturen auf Endoagar waren weifs und blieben weifs. Am 3. III. zeigten sich an einer am Rande des Impfstriches stehenden einzelnen Kolonie Knötchen, eine Abimpfung von diesen gab wieder einen rotweifsen Satz. Von den auf leichtsaurem Nährboden gewachsenen Kolonien wurde am 6. III. in gleicher Weise auf Endoagar abgeimpft, und auch hier wuchsen die Kolonien weifs. Von diesem Endoausstrich ergab eine Abimpfung 6 Tage später einen rotweifsen Plattensatz. Ebenfalls am 6. III. wurde von der alkalischen Agarplatte und am 7. III. von der neutralen Agarplatte in gleicher Weise wie oben beschrieben von mehreren Kolonien abgeimpft. Auf diesen letzteren zwei Platten war aber die Kultur rot geblieben. Es war keine einzige weifse Kolonie zu finden. Um zu sehen, ob nicht vielleicht noch später ein Umschlag zu weifs vorkommen könnte, wurde die Züchtung auf alkalischem resp. neutralem Agar fortgesetzt und zwar bis zum 9. IV. Bei jeder neuen Umzüchtung wurden Seitenzweige auf Endoagar übertragen. Diese

Kolonien zeigten, dafs die Kultur bis zum Schlusse des Versuches (9. IV.) rot geblieben war. Es gelang also in einem Falle, die rote Variation wieder zur weifsen zurückzuführen. Dafs dies nicht immer gelingt, beweist uns, dafs die neue Variation ihre erst seit kurzem erlangte Eigenschaft sehr festhält und weiter vererbt.

Die Rückzüchtung von rot zu weifs scheint nach einem anderen Modus zu erfolgen als die Bildung von weifs zu rot. In letzterem Falle werden nur einige Bakterien in der weifsen Kolonie rot, während im ersten Falle die ganze Platte von rot zu weifs umschlägt. Da aber dieser Rückschlag zu rot während der Entstehung nicht beobachtet werden konnte, wie die Entstehung der roten Variation in den weifsen Kolonien auf dem Endoagar, sondern sich erst bei einer Übertragung auf Endoagar als vollendete Sache zeigte, kann ich diese Vermutung nicht beweisen. Sicher ist, dafs keine Knötchen aufgetreten sind (es müfste sich denn um Knötchen weifser Bakterien in roten Kolonien handeln).

Die Tatsache aber, dafs die Rückbildung von rot zu weifs gelungen ist, ist ein letzter zwingender Beweis dafür, dafs unsere Kultur eine Reinkultur ist.

Unsere Zusammenfassung für diesen 3. Teil der Arbeit lautet demnach:

XIV. Die beschriebenen weifsroten Platten treten nur auf, wenn Knötchen mitverimpft wurden.

XV. Abimpfungen von jungen Kolonien vor dem Auftreten der Knötchen läfst weifse Plattensätze entstehen. Ebenso führt Abimpfung vom knötchenlosen Rand auch alter Kolonien zum Entstehen weifser Sätze.

XVI. Werden möglichst nur Knötchen verimpft, so erhält man fast rein rote Plattensätze. Die Knötchen können daher als rote Kolonien in den weifsen aufgefafst werden.

XVII. Die rote Varietät hält ihre neu erworbene Eigenschaft auch unter abnormen, schädigenden Bedingungen fest. Nur einmal ist es unter bestimmten Bedingungen gelungen, die rote Varietät wieder in die weifse zurückzuführen.

Zum Schlusse möchte ich noch einiges über meine Tierversuche bemerken. Das Bakterium ist nicht stark tierpathogen, doch gelingt es durch grofse Dosen, die gebräuchlichen Versuchstiere zu töten. Für eine Maus ist die tödliche Dose bei intraperitonealer Injektion eine drittel Öse einer Agarkultur. Die Meerschweinchen sterben nach intraperitonealer Injektion von einer halben Agarkultur. Die Dosen von einer roten Kultur sind ebenso grofs als die für die weifsen. Eine Virulenzsteigerung konnte bei der Meerschweinchenpassage nicht konstatiert werden. Die Kaninchen sind sehr verschieden resistent gegen dieses Bakterium. Die Immunisierung derselben gelingt nur schwer, und ich habe nur mit äufserster Mühe auch nur schwach agglutinierende Sera erhalten. Ich immunisierte Kaninchen eines teils mit Agarkulturen, welche von knötchenhaltigen Kolonien stammten, später als ich erkannte, dafs die Knötchen schon rote Bakterien sind, mit Kulturen, welche am 1. Tage von weifsen Kolonien abgestochen waren, anderseits mit von roten Kolonien abgeimpften Kulturen. Sowohl bei subkutaner als auch intraperitonealer oder intravenöser Einführung der Bakterien führte die Immunisierung nicht zu einem richtigen Ziele. Der höchste Titer, den ich erhielt, war 1 : 640. Wurde aber versucht, die Immunisierung weiter zu treiben, so starben die Tiere ausnahmslos. Sera von einem Titer 1 : 320 waren nicht schwer zu erlangen, auch nach wenigen Injektionen. Die rote und weifse Bakterienart wurde durch alle Kaninchensera gleich hoch agglutiniert. Die Agglutination mit diesem Koli ist da, wo sie überhaupt auftritt, sehr stark, makroskopisch leicht sichtbar und geht bei weiterer Verdünnung des Serums ohne Übergang in das vollständige Fehlen der Agglutination über. Auch Versuche, mit einer Immunisierungsmethode nach Bail höhere Titer zu erlangen, mifslangen. Die nach Bail erhaltenen Exsudate zeigten sehr verschieden starke Giftigkeit, während einige Male 5 und 10 ccm eines Pleuraexsudates bei intravenöser Injektion ohne weiteres ertragen wurden, erhielt ich einmal ein Exsudat, bei welchem die Kaninchen noch bei einer Injektion von 0,1 ccm während der Injektion starben. Luftembolie war ausgeschlossen. Der Tod trat

viel schneller, aber ohne die stürmischen Erscheinungen, wie sie bei der Luftemboli vorkommen, ein, aufserdem wurde der Versuch mit allen Kautelen nochmals mit dem gleichen Resultat wiederholt. 0,1 ccm dieses Exsudates, mit 9 Teilen physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, wurde jedoch ertragen.

Die untenstehende Tabelle zeigt eine Austitrierung eines Kaninchenserums gegen rote und weifse Bakterien unseres Koli und gegen andere Bakterienarten.

Tabelle I.

Verdünnung	Koli weiß	Koli rot	Paratyphus $\alpha + \beta$	Typhus	Dysenterie Typ. Flexner	Dysenterie Shiga
1 : 20	+++	+++	0	+	+	0
1 : 40	+++	+++	0	0	0	0
1 : 80	+++	+++	0	0	0	0
1 : 160	+++	+++	0	0	0	0
1 : 320	+++	+++	0	0	0	0
1 : 640	0	0	0	0	0	0
Kontr.	0	0	0	0	0	0

Eine sehr interessante Erscheinung möchte ich hier nicht unerwähnt lassen, welche aber wegen der sehr verschiedenen Empfindlichkeit der Kaninchen nicht konstant zu erhalten war. Wurde einem Kaninchen eine Dosis intravenös injiziert, welche in der Höhe der Dosis letalis minima stand, und ca. 0,5 ccm einer dichten Agaraufschwemmung betrug, so kam das Kaninchen davon oder blieb tagelang am Leben oder es starb in der folgenden Nacht. Wurde diese Menge von 0,5 ccm aber am 2. Tage an einem noch lebenden Tiere wiederholt, so entstand in einer grofsen Anzahl der Versuche ein eigentümlicher Symptomenkomplex. Das Tier war gerade nach der Injektion ganz munter, nach etwa $^1/_4$ Stunde aber bekam das Tier starke Dyspnoe, Lähmungen in den hinteren Beinen und oft einen deutlichen Drehschwindel. Nach $^1/_2$ Stunde starben die Tiere nach kurzen Zuckungen. Bei der Sektion war das Blut sehr dunkel, mit ziemlich viel Gerinsel, die Peritonealgefäfse waren stark injiziert, sonst konnte nichts

Abnormes bemerkt werden. Keine Hämolyse des Blutes. Die Tiere aber, welche auch auf diese 2. Injektion nicht innerhalb $^1/_2$ Stunde unter den beschriebenen Symptomen zugrunde gingen, hatten die Infektion meist überstanden, doch zeigten auch sie in der ersten $^1/_2$ Stunde eine auffallende Dyspnoe und oft auch Lähmungen, welche Erscheinungen aber wieder zurückgingen. Starben von diesen Tieren später noch in der Nacht oder in den folgenden Tagen welche, so gingen sie so zugrunde wie die Tiere, welche eine einmalige zu hohe Dosis erhalten haben. Man konnte also deutlich unterscheiden zwischen einer akuten, innerhalb $^1/_2$ Stunde unter den angeführten Erscheinungen zum Tode führenden Vergiftung bei zweimaliger Injektion an 2 aufeinanderfolgenden Tagen und dem erst nach einem oder mehreren Tagen erfolgenden Tode durch eine einmalige zu hohe Dosis. Ich stelle hier eine Tabelle zusammen aus meinen Protokollen über diese Versuche. Wo »lebt« bemerkt ist, lebte das Tier mindestens eine Woche, meist lebte es länger und wurde zur weiteren Immunisierung benutzt.

Tabelle II.

Kaninchen Nr.	I. Injektion	II. Injektion einen Tag später	Resultate	Bemerkungen
645	0,5	0,5	† nach 30 Min.	
646	0,5	0,5	† » 30 »	
648	0,5	0,5	getötet nach 1 Std. in der Agonie.	**)
650	0,5	0,5	† nach 14 Min.	
659	0,5	0,5	† » 25 »	*)
665	0,5	0,5	† » 23 »	
666	0,5	0,5	getötet n. 30 Min. in der Agonie.	**)

*) Kaninchen 659 wurde 8 Stunden nach der ersten Injektion zum zweiten Male injiziert.

**) Die Tiere wurden in der Agonie getötet, um nachher das Blut zur Injektion anderer Tiere zu gewinnen, aber erst nachdem ich die Gewifsheit gewonnen hatte, dafs sie innerhalb der nächsten Minuten sterben würden. Die Tiere lagen schon auf der Seite, hatten sehr starke Dyspnoe, zeigten spontan keine Bewegung mehr.

Zur Kontrolle diene die folgende Tabelle:

Tabelle III.

Kaninchen Nr.	I. Injektion	II. Injektion	Resultate	Bemerkungen
644	1,5	—	lebt	
656	1,0	—	»	
658	0,5	0,5	»	
664	0,5	0,5	»	III. Inj. 0,5 am III. Tage lebt.
669	0,5	0,5	»	
670	0,5	0,5	»	
657	1,0	—	† 2 Tage später	
663	0,5	0,5	do.	
651	0,5	—	† in der Nacht.	
647	0,5	0,5	nach 3 Stunden getötet.	nach 1 Std. matt, erholt s. wieder.

Ähnliche Resultate erhielt ich durch Injektion eines Giftes, das durch Filtration einer 14tägigen Bouillonkultur durch Reicheltfilter erhalten wurde. Auch hier entstand entweder akuter Tod auf der einen Seite oder Überleben bzw. später Tod auf der anderen Seite. Doch waren hier die Resultate nicht so deutlich, da oft nur eine Schwäche auftrat innerhalb $^1/_2$ Stunde, nachher aber wieder Erholung. Zur Erklärung dieses Phänomens können wohl kaum die neuerdings untersuchten Reaktionen bei Serumüberempfindlichkeit herangezogen werden, da die Zeit zur Bildung eines Antikörpers zu kurz ist. Man mufs wohl eher an eine besonders ungünstige Kumulierung oder eine besondere Art der Überempfindlichkeit denken.

Das Blut der in der Agonie geschlachteten Tiere wurde anderen Kaninchen in die Ohrvene injiziert, nachdem es vom Fibrin befreit worden war. Es wurde in sehr grofsen Mengen, bis zu 30 ccm, ertragen, ohne auch nur eine Spur von Krankheitserscheinungen zu machen. Das Serum dieser Tiere agglutinierte nach 9—14 Tagen unser Bakterium in niederen Verdünnungen.

Aus äufseren Gründen konnte ich mich mit dem Tierversuche nicht weiter abgeben. Als für unsere Arbeit wichtig hebe ich hervor, dafs kein Unterschied in der Agglutination ver-

schiedener, durch Injektion von roten oder weifsen Kulturen erhaltener Sera gegen die rote und weifswachsende Koliart bemerkt werden konnte. Dieses Resultat ist ein weiterer Beweis dafür, dafs unsere Kultur eine Reinkultur ist.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Tatsachen bieten nun einiges biologisches Interesse. Nach Rodet und auch nach Beijerinck gehört die beschriebene Veränderung zur Variation im engeren Sinne. Einige Bakterien einer Kolonie gewinnen die neue Fähigkeit, Milchzucker anzugreifen und behalten diese bei, auch wenn sie auf andere Nährböden gebracht werden. Dabei sind keine Degenerationserscheinungen wahrzunehmen. Das Bakterium hatte bis dahin nur die Fähigkeit, die beiden durch Hydrolyse zu gewinnenden Bestandteile des Milchzuckers, nämlich die Dextrose und die Galaktose, zu zerlegen. Durch das Wachstum auf Milchzucker aber erhalten einige besonders dafür befähigte Keime die neue Eigenschaft, Laktase zu bilden und auch das grofse Molekül des Milchzuckers ihrem Stoffwechsel zugänglich zu machen. Das Bakterium pafst sich einer neuen Lebensweise, den Milchzucker unter Gasbildung zu zerlegen, an. Es ist daher ganz erklärlich, dafs diese neue Art nur auf Milchzucker entsteht, und nicht durch allgemeine Einflüsse herbeigeführt werden kann. Interessant dabei ist, dafs schon sehr geringe Mengen des Milchzuckers (0,1 %) zum Agar genügen, um dem Bakterium diese neue Eigenschaft zu verschaffen, und ferner, dafs diese Umwandlung eine plötzlich auftretende ist.

Diese Arbeit bildet daher einen Beitrag aus der Bakteriologie zur Mutationstheorie, wie sie Hugo de Vries für die Botanik ausgeführt hat. De Vries teilt die erblichen Variationen in zwei prinzipiell zu scheidende Gruppen ein. Die erste nennt er (individuelle, fluktuierende) Variabilität. Jede Pflanze besitzt diese in höherem oder geringerem Mafse. Der Züchter kann sie benutzen, um durch Selektion neue Rassen zu ziehen, nie aber entsteht eine neue Art. Dadurch, dafs immer die schönsten

Pflanzen einer Kultur ausgelesen und zur weiteren Züchtung benutzt werden, erhält man Rassen, welche die vom Züchter gewünschten Eigenschaften in sehr viel höherem Maſse besitzen als die Ausgangskultur. Es entsteht aber keine neue Eigenschaft. Läſst die Selektion nach, so gehen die angezüchteten Eigenschaften nach einigen Generationen wieder zurück. Ganz anders verhält es sich bei der Mutation, der zweiten Gruppe de Vries'. Bei dieser erhält die Tochter eine Eigenschaft, welche die Mutter nicht besaſs. Diese neue Eigenschaft tritt plötzlich auf und wird von der neuen Art gleich zu Anfang zäh festgehalten. Eine Selektion ist unnötig; sobald die Mutation aufgetreten ist, wird sie vererbt. Dadurch, daſs dieses neue Merkmal konstant vorhanden ist, darf die Variation als eine neue elementare Art angesehen werden. Die Fähigkeit zu mutieren, besitzt nicht jede Pflanzenart und nicht jedes Individuum. Die Mutation tritt plötzlich auf und ist unbeschränkt in ihrer Richtung, es können für die neue Art nützliche oder schädliche Eigenschaften entstehen. Es mangelt mir hier der Raum, den interessanten Ausführungen von de Vries weiter zu folgen, und ich verweise daher auf sein Buch[17]). Es scheint mir aber erlaubt, seine Theorie in der Bakteriologie und speziell auf unseren Fall anzuwenden. Auch bei unserem Bacterium coli tritt die neue Eigenschaft plötzlich auf und ist sogleich für alle Nachkommen erblich. In den schon einige Zeit gewachsenen Kolonien mit vielen Millionen Bakterien entstehen am zweiten oder dritten Tag bei der Teilung einiger weniger Bakterien solche Bakterien, welche Milchzucker unter Gasbildung vergären können. Alle Generationen, welche auf dieselben folgen, besitzen diese Fähigkeit auch. Es entstehen darum, wenn man möglichst nur von Knötchen, welche die neuen Kolonien darstellen, Material zur weiteren Verimpfung benutzt, fast rein rote Platten. Jedenfalls erhält man aber ganz rote Platten, wenn man von einer auch noch so jungen roten Kolonie abimpft. Eine Selektion braucht dabei nicht stattzufinden, es brauchen keine besonderen Maſsregeln ergriffen zu werden, um die neue Eigenschaft den nachfolgenden Generationen zu erhalten; es bedarf im Gegenteil eines besonderen günstigen Zufalles, um

eine Kolonie zu finden, bei welcher es gelingt, die neuerworbene Eigenschaft rückgängig zu machen.

Wichtig dabei ist die Tatsache, dafs wir diese Mutation willkürlich durch einen ganz bestimmten Zusatz zum Nährboden erhalten können. Man wird ja auch in der übrigen Botanik äufsere Einflüsse annehmen müssen, welche den Anstofs zur Mutation geben, nur sind diese noch so unbestimmt und fein, dafs wir sie bis jetzt nicht analysieren können. Aufserdem mufs aber die Pflanze zur Mutation disponiert sein oder nach de Vries sich in einer Mutationsperiode befinden. In einer solchen Periode befinden sich nach de Vries nicht alle Arten zu gleicher Zeit, sondern nur einzelne Arten. Unser Kolistamm würde sich dann gerade in einer solchen befinden. Es erklärt sich daraus der Umstand, dafs diese Erscheinung der Knötchen- und Variationsbildung, trotz der vielen Arbeiten in dieser Gruppe, bis jetzt noch nicht bekannt ist.

Literaturverzeichnis.

1. M. W. Beyerinck, On different forms of hereditary variation of mikrobes (Kon. Akad. von Wetenschappen te Amsterdam, 27. Okt. 1900).
2. A. Böhme, Die Anwendung der Ehrlichschen Indolreakt. für bakteriologische Zwecke. Zentralbl. f. Bakt. etc. I. Abteil., Bd. XL, 1905, S. 1.
3. Channot et Thiry, Studies on chromogenie Bacteria. Notes on the pigment of Bac. polychromog. Ref.: Kochs Jahresber. 1900, S. 68.
4. Conn, Natürl. Varietäten von Bakterien. Ref. Zentralbl. f. Bakt. etc. Abt. I, Bd. XXVII, 1900, S. 675.
5. Ph. Eisenberg, Über sekund. Bakterienkolon. Zentralbl. f. Bakt. etc. Abt. I, Bd. XL, 1905, S. 188.
6. Krause, Beiträge zur Kenntnis d. Bac. pyocyaneus. Zentralbl. f. Bakt. etc. Abt. I, Bd. XXVII, 1900, S. 769.
7. W. Kuntze, Ein Beitrag zur Kenntnis der Bedingungen der Farbstoffbildung d. Bac. prodigiosus. Zeitschr. f. Hyg., Bd. XXXIV, 1900, S. 69.
8. Luckhard, Über Variabilität und Bedingungen der Farbstoffbildung bei Spaltpilzen. Ref. Koch, Jahresber. 1901, S. 81.
9. R. Neumann, Studien über die Variabilität der Farbstoffbildung bei Microc. pyog. α aur., Staphyloc. pyog. aur. und einigen anderen Spaltpilzen. Arch. f. Hyg., Bd. XXX, 1897, S. 1.
10. M. Neifser, Zur Differentialdiagnose d. Diphtheriebaz. Zeitschr. f. Hyg., Bd. XXIV, 1897, S. 443.
11. —, Über die Symbiose d. Influenzabazillen. Deutsche med. Wochenschr., 1903, S. 462.
12. H. Noefske, Neue Untersuchugnen über den Bac. pyocyaneus und die Gesetze der Farbstoffbildung. Ref. Koch, Jahresber. 1900, S. 72.
13. H. Preisz, Studien über Morphol. u. Biolog. d. Milzbrandbaz. Zentralblatt f. Bakt., Abt. 1, Bd. XXV, S. 280.
14. A. Rodet, De la variabilité dans les microbes. Paris 1894.
15. S. Ruczicka, Vergleich. Studien über d. Bac. pyoc. und Bac. fluoresc. liquef. Arch. f. Hyg., Bd. XXXIV, 1899, S. 149.
16. P. Schierbeck, Über die Variabilität der Milchsäurebakt. mit Bezug auf ihre Gärungsfähigkeit. Arch. f. Hyg., Bd. XXXVIII, 1900, S. 294.
17. H. de Vries, Die Mutationstheorie. Leipzig 1901 und 1903.